

RELAÇÃO ENTRE O NITROGÊNIO TOTAL E NÃO-PROTÉICO NA CIANOBACTÉRIA *Aphanothece microscópica* Nägeli

ROSANA GOLDBECK; ADRIANA G. DA SILVA; ANDRESSA C. JACQUES; SARAH L. COGO;
MARINA L. MITTERER; MARIA ISABEL QUEIROZ.

Dep. de Química / Laboratório de Biotecnologia – FURG

Rua Eng. Alfredo Huch 475, Rio Grande – RS – mariaisabel.queiroz@nailcity.com; rosanagoldbeck@yahoo.com.br

RESUMO

A *Aphanothece microscópica* Nägeli é uma cianobactéria que vem sendo estudada no sentido de associar o tratamento de efluente com a produção de proteína unicelular. Estudos relatam que esse microorganismo apresenta elevado teor de proteína com alto valor biológico, podendo ser utilizado como complemento na dieta alimentar. Deve ser salientado, em relação à quantificação de proteína, o fato de multiplicar-se o conteúdo de nitrogênio total pelo fator 6,25. Isso gera a necessidade de um estudo das frações nitrogenadas encontradas nessa biomassa, visando à quantificação de proteína em termos reais. Assim, o trabalho tem como objetivo determinar o teor de nitrogênio total e não-protéico da cianobactéria *Aphanothece microscópica* Nägeli nas diferentes fases de crescimento quando cultivada no efluente da parboilização do arroz e no meio sintético BG 11. Foram realizados experimentos com inóculo de 300 mg.L⁻¹ na fase exponencial de crescimento. No meio sintético, as condições de cultivo foram: 30°C, aeração constante, fotoperíodo de 12 horas e 2 klux de luminosidade. Para o efluente da parboilização do arroz, as condições de cultivo foram: ausência de luminosidade, 30°C, razão C/N 50, pH 8,0 e aeração constante. As amostras foram coletadas nas diferentes fases de crescimento e submetidas às determinações de nitrogênio total, nitrogênio não-protéico e nitrogênio amoniacal intracelular. Os resultados demonstram que o nitrogênio total reduz da fase logarítmica para a fase estacionária independente do meio. O nitrogênio não-protéico perfaz importante percentual do nitrogênio total, sendo o íon amônio um dos principais componentes do nitrogênio intracelular presentes na *Aphanothece microscópica* Nägeli.

PALAVRAS-CHAVES: Cianobactéria, *Aphanothece*, nitrogenados, fases de crescimento, efluente da parboilização do arroz.

ABSTRACT

RELATIONSHIP BETWEEN NON-PROTEIN AND TOTAL NITROGEN IN THE CYANOBACTERIUM

Aphanothece microscópica Nägeli

The cyanobacterium *Aphanothece microscópica* Nägeli has been studied in order to relate the treatment of effluent with the production of unicellular protein. According to some studies, this microorganism has a high level of biologically rich protein that can be employed in diet. An important factor concerning the quantification of protein is that it multiplies the total nitrogen content by the factor 6.25. It makes necessary to study nitrogen fractions which are found in this biomass, aiming to quantify the protein in real terms. Therefore, this work aims to determine the total non-protein nitrogen amount of the cyanobacterium *Aphanothece microscópica* Nägeli in different growing phases when it is cultivated in the effluent of rice parboiling as well as in the BG-11 synthetic medium. Experiments were conducted using inoculum of 300 mg.L during the growing exponential phase. In the synthetic medium, the conditions of cultivation were: 30° C, constant aeration, 12-hour photoperiod and 2 klux light. For the cultivation in the effluent of rice parboiling, the conditions were: darkness, 30° C, C/N ratio 50, pH 8,0 and constant aeration. The samples were collected in different growing phases and submitted to assessment of total, non-protein and intracellular ammoniacal nitrogen. The results show a decrease of total nitrogen from the logarithmic phase to the independent stationary phase of the medium. Non-protein nitrogen provides a significant percentage of total nitrogen in which ammonium ion is one of the main components of intracellular nitrogen in *Aphanothece microscópica* Nägeli.

KEY WORDS: cyanobacterium, *Aphanotece*, nitrogen, growing phase, rice parbolization effluent.

1 – INTRODUÇÃO

A *Aphanothece microscópica* Nägeli é uma cianobactéria natural nos corpos hídricos adjacentes à cidade do Rio Grande – RS, capaz de desenvolver-se na ausência de luz (QUEIROZ et al., 2002; QUEIROZ; ZEPKA; BASTOS, 2004). Algumas cianobactérias, como outros organismos procariontes fotossintéticos, são capazes de utilizar a respiração como metabolismo auxiliar para obtenção de energia na ausência de luminosidade (ARDELEAN; ZARNEA, 1998). Assim, o uso desses microorganismos torna-se uma alternativa aos processos de tratamento de efluente, por apresentarem um metabolismo não-fotossintético, reduzindo custos operacionais.

A utilização de cianobactérias no tratamento de efluentes industriais vem sendo estudada na FURG com diferentes enfoques, como a diminuição do impacto ambiental e produção de proteína unicelular. O interesse no cultivo desses microorganismos fundamenta-se em suas variadas e possíveis aplicações, tais como alimentação, produção de energia química, extração de pigmentos, entre outras substâncias celulares de interesse industrial, e no tratamento de águas residuárias. Outros fatores que despertam o interesse na produção de cianobactérias em larga escala para alimentação humana são: o fato de apresentarem alta taxa de crescimento, resultando em alta produção de nutrientes, particularmente proteínas, e de utilizarem como substrato para seu crescimento fontes baratas de energia, muitas vezes resíduos industriais. Dessa forma, determinam vantagens tecnológicas e comerciais quando comparadas com técnicas convencionais de produção de proteína (ANUPAMA; RAVINDRA, 2000; BURJA et al., 2001).

No que se refere à determinação da concentração protéica das cianobactérias, é comum multiplicar-se o conteúdo de nitrogênio total pelo fator 6,25 (ESQUIVEL; VOLTOLINA; SANDOVAL, 1993; LOURENÇO et al., 1997; QUEIROZ et al., 1998). No entanto, o uso desse fator considera frações nitrogenadas não-protéicas,

induzindo à superestimação do valor real da fração protéica.

Em face disso, este trabalho tem como objetivo determinar o teor de nitrogênio total e não-protéico da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli, nas diferentes fases de crescimento, quando cultivada no efluente da parboilização do arroz e no meio sintético BG 11.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Manutenção e preparo do inóculo

Uma monocultura de *Aphanothece microscopica* Nägeli foi obtida junto à Unidade de Pesquisa de Cianobactérias da FURG (Rio Grande, RS, Brasil) e então inoculada e mantida em meio padrão BG11 (RIPKA et al., 1979), em câmara de cultivo, com controle de luminosidade de 2 klux, temperatura de 30°C e fotoperíodo de 12h, conforme indicado por Bastos, Padilha e Beneri (2000).

A concentração de inóculo foi determinada por gravimetria a partir de alíquota de 50ml de cultura na fase exponencial de crescimento, centrifugada por 15 minutos a 4000rpm. A biomassa foi recuperada, ressuspensa em água destilada e filtrada em filtro milipore. O material obtido foi seco a 105°C até peso constante. Uma vez quantificada a biomassa, um volume de cultura equivalente a 300mg.L⁻¹ foi então centrifugado segundo o mesmo procedimento utilizado para quantificação, e a biomassa sedimentada foi então utilizada nos experimentos.

2.2 – Caracterização do efluente da parboilização do arroz

O efluente da parboilização do arroz foi coletado diretamente dos tanques de maceração de uma indústria beneficiadora de arroz da cidade de Pelotas, RS, transportado em garrafas de polietileno até o Laboratório de Biotecnologia da FURG e caracterizado quanto a sua DQO (demanda química de oxigênio), N-TK (nitrogênio total Kjeldahl) e pH.

2.3 – Ajuste da razão C/N

A razão C/N foi calculada mediante a relação entre a DQO e o N-TK. Esta foi ajustada a 50 pela adição de sacarose ou sulfato de amônio, conforme indicado por Lopes et al. (2003).

2.4 – Cultivo em meio BG 11

Os experimentos foram realizados utilizando o meio sintético BG 11 como meio de cultivo para a cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli. Foi inoculado 300mg/L desse microorganismo em um reator descontínuo de mistura completa, nas condições de 2 klux de luminosidade, 30 °C, fotoperíodo de 12 horas e aeração constante através de pedras porosas. Foram monitorados em intervalos de tempo de quatro horas e retiradas alíquotas de amostra para posteriores determinações analíticas e construção da curva de crescimento.

2.5 – Cultivo no efluente da parboilização do arroz

Foram realizados experimentos utilizando o efluente da parboilização do arroz como meio de cultivo para a cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli. Foi inoculado 300mg/L desse microorganismo em um reator descontínuo de mistura completa, nas condições de 30°C, ausência de luminosidade, aeração constante através de pedras porosas, razão C/N 50 e pH 8,0. Os experimentos foram monitorados em intervalos de quatro horas e retiradas alíquotas de amostra para posteriores determinações analíticas e construção da curva de crescimento.

2.6 – Monitoramento e amostragem

As tomadas de amostras foram feitas a partir da definição das curvas de crescimento, no início, meio e fim da fase exponencial e também na fase estacionária de crescimento. As amostras coletadas foram filtradas em filtro milipore com membrana 0,45µm e secas até peso constante a 60 °C. Após a secagem, a membrana contendo as células foi pesada e a biomassa determinada por diferença de peso seco.

A cinética de crescimento para esse microorganismo foi determinada segundo os parâmetros cinéticos indicados por Baily e Ollis (1986) e Ahmad e Holland (1995), conforme as seguintes equações:

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

onde: μ_{max} é a máxima velocidade específica de crescimento do microorganismo (h^{-1});

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

dt : variação do tempo (h);

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

Com a integração da velocidade de crescimento se obtém a equação do crescimento exponencial:

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

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

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

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

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

O tempo de geração, que corresponde ao tempo necessário para que o microorganismo se duplique na fase exponencial, foi calculado conforme a equação a seguir.

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

onde: tg é o tempo de geração (h);

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

2.7 – Determinação do nitrogênio total Kjeldahl

A biomassa retida em filtro milipore e seca em estufa a $60^\circ C$ foi submetida à determinação de nitrogênio total Kjeldahl (APHA, 1995).

2.8 – Determinação do nitrogênio não-protéico

O nitrogênio não-protéico foi determinado no sobrenadante obtido após a precipitação das proteínas com ácido tricloroacético (TCA) 5%, conforme método indicado por Campos e Nussio (2004).

2.9 – Determinação do nitrogênio amoniacal intracelular

Os íons amônio presentes na biomassa foram determinados conforme Solorzano (1972, indicado por Baptista, Baumgarten e Niencheski, 1987).

2.10 – Análise estatística

Os resultados foram tratados mediante o módulo de Análise de Variância do programa *STATISTICA 6.0*.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios de caracterização do efluente da parboilização do arroz que compreendem os parâmetros: pH, nitrogênio total (N-TK), matéria orgânica (DQO) e razão C/N estão expressos na Tabela 1.

TABELA 1 – Valores médios de caracterização do efluente da parboilização do arroz

*Parâmetros	Valores médios	**C.V. (%)
pH	4,16	0,48
N-TK	142,88 $mg.L^{-1}$	1,24
DQO	2941,20 $mg O_2.L^{-1}$	0,40
Razão C/N	20,58	1,05

** C.V.: coeficiente de variação

Estes valores estão de acordo com os obtidos por Queiroz et al. (2002), que registraram amplitudes de variação de 2000 a 8480 mg.L⁻¹, 106 a 231mg.L⁻¹ e 4,02 a 5,80 para DQO, N-TK e pH respectivamente. Variações de pH entre 4 e 5,5 são esperadas, uma vez que, de acordo com Amato e Silveira (1991), o pH da água de maceração do arroz, diminui com o tempo de maceração, resultando em uma água residuária com pH na faixa ácida. Segundo esses dados, o pH do efluente a ser utilizado como meio de cultivo da cianobactéria em estudo deverá ser aferido, uma vez que, de acordo com Ripka et al. (1979), o pH ótimo indicado para o crescimento de cianobactérias em meio BG 11 é 7,6. No que se refere ao cultivo da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli no efluente da parboilização do arroz, Lopes et al. (2003), otimizando as condições de cultivo no efluente da parboilização do arroz, indicaram pH 8,0 como ótimo no processo de remoção de nitrogênio e matéria orgânica na ausência de luz.

Variações em DQO e N-TK resultam em flutuações nas razões C/N, parâmetro este determinado por Lopes et al. (2003) como fundamental para otimização do processo de tratamento do efluente da parboilização do arroz. Observa-se na Tabela 1 que a razão C/N registrada (20,58) é equivalente à requerida para o desenvolvimento de microorganismo (C/N = 20), conforme Pearson (1990). No entanto, de acordo com Lopes et al. (2003), as maiores remoções de nitrogênio (72,44%) e matéria orgânica (83,44%) nesse efluente ocorrem na razão C/N 50. A partir dessa constatação, para o efluente da parboilização do arroz faz-se necessário o ajuste do pH a 8,0 e razão C/N 50.

A avaliação da cinética da *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no meio padrão BG 11 e no efluente da parboilização do arroz pode ser avaliada na Tabela 2, em que são expressos os parâmetros máxima velocidade de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e tempo de geração (tg), calculados com base no tempo de duração da fase log e das concentrações celulares iniciais e finais.

TABELA 2 – Variáveis cinéticas para o microorganismo cultivado no meio padrão BG 11 e no efluente da parboilização do arroz

*Variáveis cinéticas	Meio BG 11	Efluente
Δt	120	36
X (mg/L)	833	1784
X ₀ (mg/L)	458	448
$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	0,005	0,038
tg (h)	138,63	18,24

* Δt : Intervalo de tempo da fase exponencial de crescimento; X: Concentração celular final; X₀: Concentração celular Inicial; $\mu_{\text{máx}}$: Máxima velocidade específica de crescimento; tg: Tempo de geração.

Analisando os dados, verifica-se que a duplicação celular no meio BG 11 ocorreu a partir das 138,63 h com uma máxima velocidade de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) de 0,005 h⁻¹, enquanto no cultivo no efluente da parboilização do arroz com razão C/N 50 a máxima velocidade de crescimento do microorganismo ($\mu_{\text{máx}}$) foi de 0,038 h⁻¹ e o tempo de geração de 18,24 h, resultado semelhante ao registrado por Bastos (2002), que apresentou máxima velocidade específica de crescimento de 0,038 h⁻¹ e tempo de geração de 18,20 h para o mesmo microorganismo em estudo, inoculado no efluente da parboilização do arroz com razão C/N de 46,2.

As Figuras 1 e 2 expressam o comportamento da curva de crescimento da *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no meio padrão BG 11 e no efluente da parboilização do arroz. No eixo das abcissas é registrado o tempo de cultivo em horas e na ordenada o logarítmico neperiano da concentração celular.

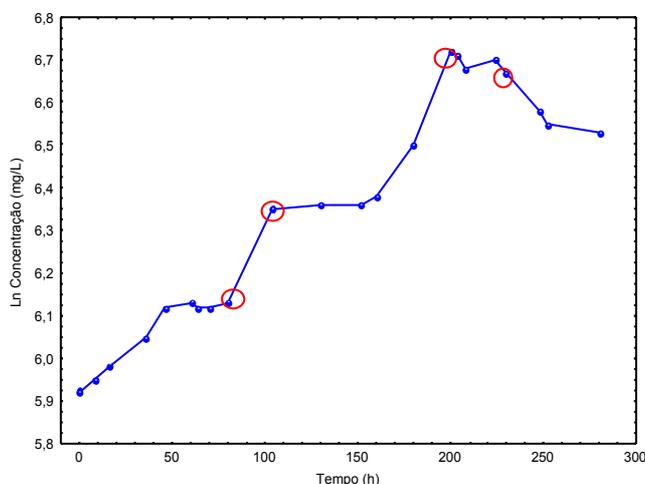


FIGURA 1 – Curva de crescimento para a *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no meio padrão BG 11 (valores médios de três repetições)

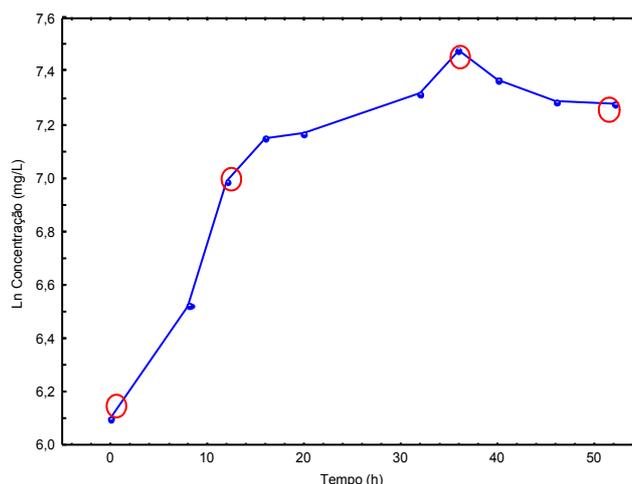


FIGURA 2 – Curva de crescimento para a *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente da parboilização do arroz (valores médios de três repetições)

Nos Gráficos 1 e 2, são destacados quatro pontos de tomada de amostra, correspondendo ao início, meio e final da fase log e fase estacionária de crescimento, determinados a partir da fase logarítmica de crescimento. O cultivo no meio padrão BG 11 teve início após 80 horas de cultivo, com duração de 120 horas. No cultivo no efluente da parboilização do arroz, essa fase teve duração de 36 horas. O intervalo de duração da fase exponencial varia de um microorganismo para outro, em função das condições do meio, idade do inóculo e seu estado fisiológico (Meeks e Castenholz, 1971).

A Tabela 3 expressa os valores médios e coeficientes de variação para os resultados obtidos na determinação de nitrogênio total (N-TK) na biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente da parboilização do arroz e no meio BG 11 para as diferentes fases de crescimento.

TABELA 3 – Médias e coeficientes de variação para o parâmetro N-TK para *Aphanothece* cultivada no efluente da parboilização do arroz e no meio padrão BG 11.

Fases de Crescimento	Efluente N-TK (mg N/g)			Meio BG 11 N-TK (mg N/g)		
	Média	C.V.(%)	%N-TK (Biomassa)	Média	C.V.(%)	%N-TK (Biomassa)
Início da fase log	7,778 ^a	10,15	14,48	11,387 ^a	4,13	21,20
Meio da fase log	7,054 ^a	18,08	13,48	9,529 ^b	12,10	18,22
Final da fase log	8,336 ^a	3,36	15,18	9,647 ^b	8,39	17,57
Fase estacionária	6,916 ^a	23,77	13,53	8,358 ^b	7,94	16,35

*C.V.: Coeficiente de variação.

** Combinações de letras diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$). 8 repetições.

Na biomassa cultivada no efluente da parboilização do arroz, o teor de nitrogênio total variou de 13,48% a 15,18% em relação à biomassa seca nas diferentes fases de crescimento. Segundo Saha, Uma e Subramanian (2003), o nitrogênio compreende em torno de 10% do peso seco celular nas cianobactérias. Sherman et al. (1995) estudaram a composição e toxicidade da cianobactéria *Cyanothece* sp. e reportaram que esse microorganismo apresenta em sua composição celular em torno de 8 a 9% de nitrogênio. Venkataraman et al. (1981) estudaram o teor protéico na biomassa liofilizada da *Spirulina platensis* e registraram teores de nitrogênio total na biomassa seca de 8,56%. Segundo Lourenço (1996), a disponibilidade de nutrientes no meio condiciona a composição química das cianobactérias. Isso justifica as variações encontradas no teor de nitrogênio presente na biomassa das diferentes espécies de cianobactérias submetidas a diferentes condições de cultivo.

A Tabela 4 expressa os valores médios e coeficiente de variação para os resultados obtidos na determinação de nitrogênio não-protéico (N-NP) no microorganismo em estudo cultivado no efluente da parboilização do arroz e no meio padrão BG 11 para as diferentes fases de crescimento.

TABELA 4 – Médias e coeficientes de variação para o parâmetro N-NP para *Aphanothece* cultivada no efluente da parboilização do arroz e no meio padrão BG 11

Fases de Crescimento	Efluente			Meio BG 11		
	N-NP (mg N/g) Média	C.V.(%)	%N-NP (N-TK) (Biomassa)	N-NP (mg N/g) Média	C.V.(%)	%N-NP (N-TK) (Biomassa)
Início da fase log	3,028 ^a	8,22	38,93 5,64	5,945 ^a	5,99	52,21 11,07
Meio da fase log	3,553 ^a	26,25	50,37 6,79	3,707 ^b	17,49	38,91 7,08
Final da fase log	3,041 ^a	28,84	36,49 5,54	3,451 ^b	23,48	35,77 6,28
Fase estacionária	2,223 ^a	17,45	32,14 4,35	5,479 ^a	11,89	65,56 10,72

*C.V.: Coeficiente de variação.

** Combinações de letras diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$).
8 repetições.

No cultivo no efluente da parboilização do arroz foram registrados teores de nitrogênio não-protéico em relação à biomassa seca de 4,35% a 6,79%, enquanto no cultivo em meio BG 11 foram encontrados valores que variaram de 6,28% a 11,07% de nitrogênio não-protéico na composição da biomassa seca.

Comparando os valores de nitrogênio total (N-TK) e nitrogênio não-protéico (N-NP) encontrados na biomassa cultivada no meio BG 11 e no efluente da parboilização do arroz, verifica-se que os teores de N-TK e N-NP foram superiores na biomassa cultivada no meio padrão. Essa constatação demonstra a influência do meio de cultivo, bem como das condições de cultivo na composição da biomassa gerada. Segundo Mori et al. (2003), as cianobactérias respondem a mudanças no ambiente físico e químico, com adaptações fisiológicas geneticamente programadas. Condições ambientais produzem conseqüências bioquímicas e induzem adaptações fisiológicas semelhantes.

Os valores médios e coeficiente de variação para os resultados obtidos na determinação de íons amônio ($N-NH_4^+$) no microorganismo em estudo cultivado no efluente da parboilização do arroz e no meio padrão BG 11 para as diferentes fases de crescimento, bem como a equivalência em porcentagem de nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio não-protéico, estão expressos na Tabela 5.

TABELA 5 – Médias e coeficientes de variação para o íon amônio intracelular da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente da parboilização do arroz e no meio padrão BG 11.

Fases de crescimento	Efluente			Meio BG 11		
	N-NH4 + (mg N/g) Média	C.V.(%)	% N-NH4 + (N-NP)	N-NH4 + (mg N/g) Média	C.V.(%)	% N-NH4 + (N-NP)
Início da fase log	0,291a	2,45	9,63	0,300a	7,33	5,05
Meio da fase log	0,338a	8,71	9,52	0,404a	16,77	10,89
Final da Fase log	0,380ac	29,77	12,49	0,846c	16,98	24,53
Fase Estacionária	0,487c	12,13	21,92	0,769c	19,20	14,04

*C.V.: Coeficiente de variação.

** Combinações de letras diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$).
8 repetições.

Observa-se que a maior concentração em nitrogênio amoniacal, quando esta é cultivada no efluente da parboilização do arroz, é registrada na fase estacionária de crescimento, perfazendo 21,92% do nitrogênio não-protéico presente na biomassa, no entanto constataram-se diferenças ($p \leq 0,05$) estatisticamente definidas em função das fases de crescimento. Lourenço et al. (1997) estudaram dez espécies diferentes de microalgas marinhas, verificando que estas apresentaram em média 18 a 30% de nitrogênio não-protéico do total do nitrogênio intracelular, sendo o nitrogênio inorgânico na forma de nitrato, nitrito e amônia a principal fonte de nitrogênio não-protéico das microalgas estudadas.

Quando a biomassa foi cultivada no meio padrão BG 11, foi registrado maior teor de íons amônio no final da fase logarítmica de crescimento, perfazendo 24,53% do nitrogênio não-protéico presente na biomassa. No entanto, em valores superiores aos registrados para o efluente, conforme já mencionado, Lourenço (1996) reporta que quando o íon $N-NH_4^+$ encontra-se em altas concentrações no meio intracelular de microalgas, gera alterações no metabolismo celular que culminam em muitos casos em redução ou interrupção do processo de crescimento. Essa constatação pode justificar a baixa velocidade de crescimento registrada na Tabela 2 para o microorganismo desenvolvido no meio BG 11.

4 – CONCLUSÕES

O nitrogênio total presente na biomassa reduz da fase logarítmica para a fase estacionária, independente do meio de cultura.

O nitrogênio não-protéico perfaz importante percentual do nitrogênio total, sendo o íon amônio um dos principais componentes do nitrogênio intracelular presentes na cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli, independente dos meios de cultivo empregados.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, M. N.; HOLLAND, C. R. Growth kinetics of single-cell protein in batch fermenters. *Journal of Food Engineering*, 1995.
- AMATO, G. W.; SILVEIRA, S. F. Parboilização do arroz no Brasil. *Boletim Técnico*. Porto Alegre: CIENTEC, 1991.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 19. ed. 1995.
- ANUPAMA, P.; RAVINDRA, L. Value-added food: single cell protein. *Biotechnology Advances*, n.18, p. 459-479, 2000.
- ARDELEAN, I.; ZARNEA, G. Photosynthesis respiration interplay in cyanobacteria: fundamentals and application. In: SUBRAMANIAN, G.; KAUSHIK, B. D.; VENKATARAMAN, G. S. *Cyanobacterial biotechnology*. Science Publishers, 1998, p. 103 -107.
- BAILY, J. E.; OLLIS, P.F. *Biochemical engineering fundamentals*. 2. ed..New York: McGraw-Hill, 1986. cap. 7.
- BASTOS, R. G.; PADILHA, M.E.; BENERI, R.L. Avaliação do cultivo da *Aphanothece microscopica* Nägeli no efluente da parboilização do arroz sob diferentes condições de luminosidade. Projeto de Graduação em Engenharia de Alimentos. Rio Grande: FURG, 2000.
- BAPTISTA, J. M. R.; BAUMGARTEN, M. G. Z.; NIENCHESKI, L. F. H. *Caderno de análises em oceanografia química*. Rio Grande: Ed. da FURG, 1987. p. 64.
- BURJA, A. et al. Marine cyanobacteria – a prolific source of natural products. *Tetrahedron*, n. 590, p. 9347-9377, 2001.
- CAMPOS, F. P.; NUSSIO, C. M. B. *Métodos de análise de alimentos*. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ), 2004. p. 135.
- ESQUIVEL, B.; VOLTOLINA, D.; SANDOVAL, F. C. The biochemical composition of two diatoms after different preservation techniques. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 105, n. 2, p. 369-373, 1993.
- LOPES E. J. et al. Valoração do efluente da parboilização do arroz por incorporação de nutrientes em *Aphanothece microscopica* Nägeli. Projeto de Graduação em Engenharia de Alimentos. Rio Grande: FURG, 2003.
- LOURENÇO, S. O. *Variação da composição bioquímica de microalgas marinhas em cultivos, com ênfase nos efeitos da disponibilidade do elemento nitrogênio*. São Paulo, 1996. Tese [Doutorado] – Instituto Oceanográfico de São Paulo.
- LOURENÇO, S. O. et al. Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis* I. Composition of two culture media. *Aquaculture*, n. 148, p. 153-168, 1997.
- MEEKS, J. C.; CASTANHOLZ, R. W. Growth and photosynthesis in thermophile *Synechococcus lividus* (Cyanophyta). *Arch. Mikrobiol.*, v. 78, p. 25-41, 1971.
- PEARSON, M. J. *Toxic blue-green algae*: report of the National Rivers Authority water quality series n. 2. Rushden: Stanley L., 1990.
- QUEIROZ, M. I.; et al. Avaliação do teor de proteína da *Aphanothece sp*. Caracterização em aminoácidos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 16. *Anais...* 1998. v. 2, n. 1, p. 1089-1091.
- QUEIROZ, M. I. et al. Cinética de crescimento para a produção de proteína unicelular a partir do efluente da parboilização do arroz. In: ENCONTRO REGIONAL SUL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 7. *Anais...* Curitiba, 2002. p. 6.
- QUEIROZ, M. I.; ZEPKA, L. Q.; BASTOS, R. Evaluation of single cell-protein production by *Aphanothece microscopica* Nägeli in batch reactor. *Food Science and Biotechnology*, v. 13, n. 3, p. 215-220, 2004.
- RIPPKA, R. et al. Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*. Great Britain, n. 111, p. 1-61, 1979.
- SAHA, S. K.; UMA, L.; SUBRAMANIAN, G. Nitrogen stress induced changes in the marine cyanobacterium *Oscillatoria willei* BDU 130511. *FEMS Microbiology Ecology*. v. 45, p. 263-272, 2003.
- SHERMAN, L. A.; SCHNEEGURT, M. A.; ARIELI, B.; McKEEHEN, J. D.; STEVEN, D. S.; NIELSEN, S. S.; SAHA, P. R.; TRUMBO, P. R. Compositional and toxicological evaluation of the diazotrophic cyanobacterium *Cyanothece sp* strain ATCC 51142. *Aquaculture*, v. 134, p. 339-349, 1995.

