



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

**TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTE SECUNDÁRIO, USANDO A
MICROALGA *Chlorella sp.* IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE
CÁLCIO.**

MARIA CÉLIA CAVALCANTE DE PAULA E SILVA

CAMPINA GRANDE
2011

MARIA CÉLIA CAVALCANTE DE PAULA E SILVA

**TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTE SECUNDÁRIO, USANDO A
MICROALGA *Chlorella sp.* IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE
CÁLCIO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental do Centro de Ciência e Tecnologia da UEPB, em cumprimento aos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

ORIENTADOR: Dr. José Tavares de Sousa
CO-ORIENTADOR: Dr. Howard William Pearson

CAMPINA GRANDE
2011

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL-UEPB

S586t Silva, Maria Célia Cavalcante de Paula e.

Tratamento terciário de efluente secundário, usando a microalga *Chlorella* sp. imobilizada em matriz de alginato de cálcio [manuscrito] / Maria Célia Cavalcante de Paula e Silva. – 2011.

79 f.: il. color.

Digitado

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental), Centro de Ciências e Tecnologias, Universidade Estadual da Paraíba, 2011.

“Orientação: Prof. Dr. José Tavares de Sousa, Departamento de Engenharia Ambiental”.

“Co-orientação: Prof. Dr. Howard William Pearson, Departamento de Engenharia Ambiental”.

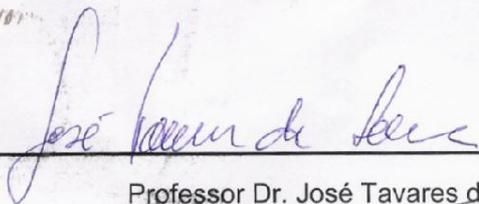
1. Tratamento de Efluente. 2. Poluição Ambiental. 3. Tratamento de Água. I. Título.

21. ed. CDD 363.728

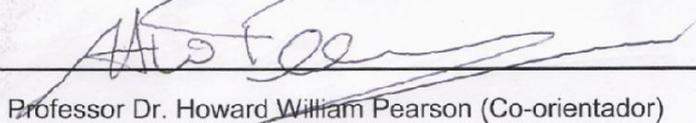
MARIA CÉLIA CAVALCANTE DE PAULA E SILVA

TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTE SECUNDÁRIO, USANDO A
MICROALGA *Chlorella sp.* IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE
CÁLCIO.

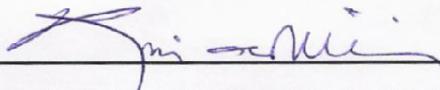
BANCA EXAMINADORA



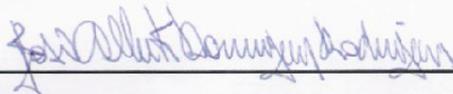
Professor Dr. José Tavares de Sousa (Orientador)



Professor Dr. Howard William Pearson (Co-orientador)



Professor Dr. Rui de Oliveira- Examinador interno



Professor Dr. José Alberto D. Rodrigues- Examinador externo

Campina Grande

2011

Dedico esse trabalho à minha mãe **BERNADETE CAVALCANTE DE PAULA** (in memoriam), por seu exemplo, personalidade forte e determinação na condução dos muitos obstáculos de sua vida, também, por seu esforço imensurável para que eu seguisse estudando. Alma especial, que seguramente norteou diversas decisões profissionais que tomei em minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades diárias de trabalhar, crescer e servir;
Aos meus familiares diretos, meu pai Manoel, meus irmãos Edvaldo, Valdemir, Ari, Inaldete e Bárbara por sua contribuição e compreensão nas minhas ausências;

Em especial ao meu esposo Rômulo e meus filhos Nicole e Alexandre pela tranquilidade que trouxeram para minha alma nos momentos mais difíceis ao decorrer do desenvolvimento do trabalho;

À minha sogra Eunice, cunhados, cunhadas e sobrinhos que me enchem de gratidão e orgulho por integrarem minha eterna família;

Aos meus companheiros da Evangelização Espírita Infanto-Juvenil que bondosamente procuraram preencher as lacunas por mim deixadas no trabalho ao longo dos últimos dois anos;

Aos meus amigos do mestrado, pessoas com quem partilhei “dias bons”, de retomada da minha vida acadêmica;

Aos meus amigos da EXTRABES, que têm grande participação neste trabalho final, destacando a pessoa especial de Diego;

Aos meus coordenadores e supervisores das escolas onde trabalho, por sua compreensão com o meu não cumprimento de alguns prazos, contribuindo assim, para a conclusão deste curso;

Aos meus orientadores professores José Tavares de Sousa e Howard William Pearson, pela orientação, paciência, dedicação fomentando a finalização desta valiosa etapa de minha vida;

Aos professores, Rui de Oliveira e José Alberto Domingues Rodrigues, aceitarem participar desta banca de dissertação;

Aos secretários do MCTA, Rodrigo e Isabel, pelo prestimoso atendimento dispensado em todas as vezes que busquei esse setor;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, por todo o conhecimento repassado;

A todas aquelas pessoas que de forma direta ou indireta deram sua contribuição a este trabalho.

“Se vi mais longe, foi porque me apoiei nos ombros de gigantes”.

ISAAC NEWTON.

RESUMO

A contaminação dos mananciais por esgotos domésticos e industriais é um dos principais causadores da poluição ambiental, gerando eutrofização e queda na qualidade sanitária dos recursos hídricos. Há algumas décadas, as algas imobilizadas têm sido usadas no tratamento de águas residuárias. A tecnologia de imobilização de microalgas em esferas de alginato de cálcio aumenta a longevidade fotossintética, viabilidade, durabilidade e atividade biocatalisadora celular. Esse estudo investigou em escala de laboratório, o potencial da microalga *Chlorella sp.* na remoção de fósforo e coliformes termotolerantes de efluente secundário. As cepas de *Chlorella sp.* foram isoladas de um sistema de 4 lagoas rasas com dimensões de 1m de largura, 5m de comprimento e 0,5m de profundidade que tratava lixiviado, com alta concentração de nitrogênio amoniacal. O sistema experimental constituiu-se por 10 bioreatores (volumes de 0,1L e 1,0L), preenchidos com algas imobilizadas em esferas de alginato de cálcio em concentrações de 2%, 4% e 6%. Os bioreatores foram alimentados por efluente do TS (tanque séptico) e do FI (filtro intermitente) em regime de batelada intermitente com tempo de contato de 3 e 5 h para fósforo, e 6 h para coliformes termotolerantes. O experimento foi realizado em temperatura controlada de 27^o C e sob a iluminação de 4 lâmpadas fluorescentes de 40 Watts. Os principais mecanismos envolvidos no tratamento dos efluentes foram a atividade fotossintética das algas e as reações bioquímicas entre os constituintes da matriz imobilizante e o efluente. Remoções significativas de fósforo total (80%) ocorreram em 3 h de contato em bioreatores com 0,1L e 1,0L de volume e reduções médias de 99,9999% de coliformes termotolerantes em 6 horas de contato dos afluentes (concentração média de 10⁶ UFC/100mL). Em bioreatores com 1L de volume com algas imobilizadas em alginato a 4% e 6%, o grande volume de esferas e elevada concentração de alginato, dificultaram a penetração da luz, comprometendo a qualidade do efluente final.

Palavras Chave: *Chlorella sp.* em alginato de cálcio , algas imobilizadas, remoção de fósforo e coliformes termotolerantes em algas imobilizadas.

ABSTRACT

The contamination of water bodies by domestic and industrial wastewaters is one of the principle causes of environmental pollution causing eutrophication and a reduction in the sanitary quality of water resources. During various decades immobilized algae have been used in the treatment of wastewaters. The technology of immobilizing microalgae in beads of calcium alginate increases the photosynthetic longevity, viability, durability and cellular activity, This study investigated at laboratory scale, the potential of the microalgae *Chlorella sp.* in removing phosphorus and thermo-tolerant coliform bacteria from secondary effluents. The strains of *Chlorella sp.* species were isolated from a series of four shallow waste stabilization ponds 1m in width, 5m in length and 0.5m deep that were treating sanitary landfill leachate with high concentrations of ammonia. The experimental system comprised 10 bioreactors (with volumes from 0.1 to 1L), filled with beads of microalgae immobilized in calcium alginate at concentrations of 2%, 4% and 6%. The bioreactors were fed with effluent from a septic tank (TS) and from an intermittent sand filter (receiving the septic tank effluent). The bioreactors were operated in batch mode with contact times of 3 and 5h for phosphorus removal and 6h for thermo-tolerant coliform removal. The experiments were performed at 27⁰C and with illumination provided by 4 fluorescent tubes of 40 watts. The principal mechanisms involved in the treatment of the effluents were the photosynthetic activity of the microalgae and the biochemical reactions between the constituents of the immobilizing matrix and the effluent. Significant removals of total phosphorus (80%) occurred with 3h of contact in the bioreactors of volumes of 0.1 and 1.0L and mean reductions of 99,9999% for thermo-tolerant coliforms with contact times of 6h with the influent (mean concentration of 10⁶ CFU/100ml) using bioreactors of a volume of 0.1L. In the bioreactors of 1L volume with microalgae immobilized in 4 and 6% alginate, the large volume of algal beads and the elevated concentrations of alginate limited light penetration and compromised effluent quality.

Keywords: Immobilized *Chlorella sp.*, calcium alginate beads, phosphorus removal, thermo-tolerant coliform removal.

Lista de Figuras

FIGURA 1: Formação do gel de alginato de cálcio por engaiolamento.	26
FIGURA 2: Modelo “Egg-Box”, para a formação do gel de alginato com íons de cálcio.	27
FIGURA 3: Estrutura química do alginato- bloco heteropolimérico.....	31
FIGURA 4: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da estrutura interna do “bead” da matriz de alginato de cálcio com microalgas do gênero <i>Chlorella</i> imobilizadas (SIAN, 1984).	31
FIGURA 5: Esquema do isolamento, cultivo e imobilização da <i>Chlorella sp.</i>	36
FIGURA 6-a: Esferas com algas imobilizadas	38
FIGURA 6-b: Diâmetro de esfera com algas imobilizadas.....	38
FIGURA 7: Culturas de <i>Chlorella sp.</i> após 72 horas de inoculação.....	39
FIGURA 8: Cultivo de <i>Chlorella sp.</i> pronto para imobilização.....	40
FIGURA 9: Fotomicrografia em microscópio óptico com <i>Chlorella sp.</i> (A=400x).	40
FIGURA 10: Bioreatores- Etapa I-A, microalgas e controle.	43
FIGURA 11: Bioreatores- Etapa I-B, controle, 2%, 4% e 6%	44
FIGURA 12: Bioreatores- Etapa II, microalgas e controle.....	45
FIGURA 13: Bioreatores- Etapa III, 4% e 6%.....	46
FIGURA 14: Diâmetro das esferas antes da montagem do experimento (mm).....	47
FIGURA 16: Resultados da medição de diâmetro de 50 esferas com microalgas imobilizadas (mm).	51
FIGURA 17: (a) esferas após 3 de imersão no MBB e (b) esferas com 7 dias de imersão no MBB.	53
FIGURA 18: Valores médios de pH dos reatores controle e com algas imobilizadas	56
FIGURA 19: Remoção média de 9 determinações de fósforo total durante a batelada.....	57

FIGURA 20: Remoção média de 9 determinações de ortofosfato durante a batelada.....	58
FIGURA 21: Remoção média de 9 determinações de fósforo total durante.....	59
FIGURA 22: Remoção média de 9 determinações de ortofosfato solúvel durante	59
FIGURA 23: Remoção média de fósforo total em bioreatores de 0,1 L.....	62
FIGURA 24: Remoção média de fósforo total em bioreatores de 1L- controle e com <i>Chlorella sp.</i>	63
FIGURA 25: Remoção média de fósforo total no bioreator 4% em concentração de 5,33 mg.P/L.....	65
FIGURA 26: Remoção media de fósforo total no bioreator 4% em concentração de 10,82 mg.P/L.....	66
FIGURA 27: Remoção média de fósforo total no bioreator 6% em concentração de 5,33 mg.P/L.....	66
FIGURA 28: Remoção média de fósforo total no bioreator 6% em concentração de 10,82 mg.P/L.....	67

Lista de Tabelas

TABELA 1: Composição do meio de cultivo - Meio Basal Bold's (MBB) em mg. L ⁻¹	35
TABELA 2: Principais características operacionais da realização dos ensaios	42
TABELA 3: Parâmetros avaliados e métodos analíticos adotados.....	46
TABELA 4: Caracterização do efluente utilizado para alimentar os bioreatores.....	55
TABELA 5: Valores médios de remoção de coliformes termotolerantes (bioreatores de 0,1L).....	60

Lista de Símbolos e Abreviaturas

ANOVA: Análise de Variância

APHA: American Public Health Association

CO₂: Dióxido de Carbono

FCR: Força centrífuga relativa

HCO₃⁻: íon bicarbonato

L: Litro

MBB: Meio basal Bold's

m: Metro

mg/L: Miligramas por litro

mm: Milímetro

M: Molar

mm²: milímetro quadrado

mm³: milímetro cúbico

N: Nitrogênio

O₂: oxigênio

OD: Oxigênio Dissolvido

OH⁻: íons hidroxila

P: Fósforo

pH: Potencial Hidrogeniônico

r.p.m: Rotação por minuto

t: Tempo

µg: Micrograma

CaCl₂: Cloreto de cálcio

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo Geral	19
2.2. Objetivos Específicos	19
3. REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1. Lagoas de Estabilização.....	20
3.1.1. Remoção de nutrientes e coliformes termotolerantes nos sistemas de lagoas de estabilização	20
3.2. A biotecnologia e as aplicações dos sistemas imobilizados.....	21
3.2.1. Adsorção	23
3.2.2. Flocculação	23
3.2.3. Ligação covalente	24
3.2.4. Ligação cruzada	24
3.2.5. Aprisionamento em membranas semipermeáveis.....	25
3.2.6. Aprisionamento em gel.....	25
3.3. A tecnologia de imobilização das microalgas em matriz de alginato de cálcio.....	27
3.4. A <i>Chlorella sp.</i>	28
3.5. Alginato: características e aspectos tecnológicos	30
3.6. Remoção de fósforo de águas residuárias por meio de algas Imobilizadas	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1. Localização do experimento.....	34
4.2. Metodologia.....	34
4.2.1. ENSAIOS PRELIMINARES.....	34
4.2.1.1. Isolamento e cultivo da <i>Chlorella sp.</i> em Meio Basal Bold's.....	34

4.2.1.2. A imobilização da <i>Chlorella sp.</i> em esferas de alginato	36
4.2.1.3. Medição das esferas	38
4.2.1.4. Crescimento e manutenção da cultura de <i>Chlorella sp.</i>	38
4.3. ENSAIOS CONCLUSIVOS	41
4.3.1. Caracterização dos bioreatores e das condições de realização do experimento.....	41
4.3.2. Etapas da monitoração dos bioreatores	42
4.3.2.1. Etapa I-A	42
4.3.2.2. Etapa I-B	43
4.3.2.3. Etapa II	44
4.3.2.4. Etapa III	45
4.3.2.5 Métodos analíticos	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1. EXPERIMENTOS PRELIMINARES	47
5.1.1. Medição das esferas	47
5.1.2. O pH do meio de cultivo	48
5.1.3. Curva de crescimento da <i>Chlorella sp.</i>	48
5.1.4. Crescimento da <i>Chlorella sp.</i> no interior da esfera.....	50
5.1.5. Indicações de desestruturação do material suporte	50
5.1.6. Longevidade das algas imobilizadas	52
5.2. EXPERIMENTOS CONCLUSIVOS (Monitoração dos bioreatores)	54
5.2.1. Caracterização do efluente.....	54
5.2.2. ETAPA I-A (Bioreatores de 0,1L alimentados com efluente do tanque séptico).....	55
5.2.2.1. Análise de pH	55
5.2.2.2. Remoção de fósforo	56

5.2.2.3. Decaimento de coliformes termotolerantes	60
5.2.3. ETAPA I-B (Bioreatores de 0,1L alimentados com efluente do filtro de areia)	61
5.2.4. ETAPA II (Bioreatores de 1L com algas imobilizadas e controle, alimentados com efluente do filtro de areia)	63
5.2.5. ETAPA III (Bioreatores de 1L com algas imobilizadas em concentrações de 4% e 6% de alginato, alimentados com efluente do filtro de areia)	64
5.2.5.1. pH.....	67
6. CONCLUSÕES	69
RECOMENDAÇÕES.....	70
7. REFERÊNCIAS.....	71

1. INTRODUÇÃO

As ações antrópicas de ordem social ou econômica no meio ambiente têm desencadeado significativas modificações que estão ameaçando a vida do ser humano. Na atualidade, os efeitos dessa degradação são percebidos na biocenose, pois os diversos resíduos gerados são normalmente dispostos de forma incorreta e sem o devido tratamento. Essa constatação é registrada no Brasil e no mundo, onde a urbanização desenfreada, bem como a concentração da população e das atividades industriais sobre o mesmo espaço, tem contribuído para a eutrofização dos corpos d'água através do despejo de águas residuárias sem tratamento adequado.

A variada quantidade de substâncias e formas de vida que compõem as águas residuárias, despejos provenientes dos diversos usos da água, organismos tais como bactérias, vírus, helmintos e protozoários que, em sua maioria, são liberados com os dejetos humanos. Dentre esses organismos, alguns são patogênicos, outros são importantes no tratamento das águas residuárias, pois decompõem a matéria orgânica; a presença de outros organismos ainda é interpretada como indicativo de contaminação fecal. A *Escherichia coli* e coliformes termotolerantes são reconhecidamente os indicadores universais de contaminação fecal (BAUDISOVA, 1997; EDBERG et al., 2000; LECLERC et al., 2001) e quanto maior o seu número, maior é a probabilidade de encontrar patógenos. Evidentemente, quando essas águas residuárias são lançadas nos corpos d'água sem o devido tratamento, causam impactos ambientais negativos e de saúde pública.

Tratar esgotos sanitários por processo biológico, a exemplo de lagoa de estabilização, é uma realidade, sobretudo no nordeste do Brasil onde a localização geográfica possibilita o aproveitamento de mais de 84% da radiação solar incidente com duração média 2800 horas. ano⁻¹ (SOUSA et al., 2005). Tratar maior volume de esgotos em menor área traz, no mínimo, duas vantagens, evita a perda de água por evaporação e diminui os custos com a aquisição de área a construção da lagoa. Nesse aspecto, utilizar algas

imobilizadas pode ser uma tecnologia que favorece a concretização desses benefícios. Pesquisas realizadas nas últimas 3 (três) décadas, apontam as vantagens operacionais, econômicas e ambientais oferecidas pelo uso da microalga *Chlorella sp.* em meio imobilizado. Sendo assim, considera-se relevante a realização de pesquisas focadas nesse tratamento específico. Vários trabalhos (ROBINSON et al., 1985; MEGHARAJ et al., 1992; FORREST, 1998; PAGE, 2000; TAM e WONG, 2000; DE-BASHAN et al., 2002) têm demonstrado que esse tratamento remove significativamente os coliformes termotolerantes, vírus e nutrientes de águas residuárias, sendo ainda inédita a sua aplicação no Brasil. Os processos convencionais de remoção por desinfecção ou diminuição da concentração de patógenos são, razoavelmente, eficientes, porém seus subprodutos químicos são perigosos e, em alguns casos, carcinogênicos, a exemplo dos organoclorados (SUASSUNA, 2001).

Na concepção de (MEGHARAJ et al., 1992), a imobilização das microalgas é uma técnica que aumenta a longevidade fotossintética, a viabilidade e a atividade biocatalisadora celular, apresenta baixos custos, previne que a biomassa seja levada para fora dos bioreatores, oferece um grande avanço na flexibilidade operacional e na fácil separação das algas dos efluentes tratados (MEGHARAJ et al., 1992; MALLICK e RAI, 1993; TAM e WONG, 2000). Em Chevalier, (1985) e La Nöue, (1985), está registrado que o primeiro estudo conhecido envolvendo as algas imobilizadas data de 1966, (HILLER e PARK, 1966), e que somente na década de oitenta é que LA NOÛE e os seus colaboradores apareceram como pioneiros na introdução da tecnologia de imobilização de algas para o tratamento de águas residuárias principalmente na remoção de nitrogênio e fósforo. A partir dos anos 1990, diversos trabalhos com algas imobilizadas foram publicados e muitos desses referiam-se ao tratamento de águas residuárias. Em 1992, um estudo indicou que *Chlorella vulgaris*, imobilizada em meio de alginato de cálcio era cinco vezes mais eficiente na remoção de nutrientes de água residuária do que quando aquela alga se encontrava 'dispersa no meio aquático (MEGHARAJ et al., 1992).

TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTE SECUNDÁRIO, USANDO A
MICROALGA *Chlorella sp.* IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE
CÁLCIO.

As algas constituem um dos grupos mais diversificados de microrganismos existentes nas lagoas de estabilização, nas quais se verifica a predominância de algas verdes (*Chlorophyta*), destacando-se as microalgas do gênero *Chlorella sp.*, que são microrganismos fotossintetizantes clorofilados e sem flagelos. Segundo Munoz e Guieysse (2006) as microalgas favorecem a remoção de nutrientes, contaminantes orgânicos, metais pesados e microrganismos patogênicos das águas residuárias domésticas, e que, o uso de sistemas de biomassa imobilizada não apresentam as dificuldades da separação das algas do efluente final dos reatores. Em estudo desenvolvido por (ZHANG et al., 2008) foi isolado *Scenedesmus sp.* de esgoto municipal, concentração de 2×10^8 células/ mL, e posteriormente imobilizadas em camadas de alginato de cálcio, para remover nutrientes (N e P) de efluentes secundários, conseguiram completa remoção de NH_4^+ e PO_4^{3-} após 4 horas de tratamento, indicando portanto que essa microalga possui alta potencialidade na remoção de nutrientes. Moreno-Garrido (2008) relatou pesquisas em técnicas de imobilização usando microalgas de água doce e marinhas conclui que os sistemas mistos de bactérias-algas imobilizadas favorecem o tratamento de águas residuárias.

As atividades humanas e os usos múltiplos dos recursos hídricos tais como abastecimento público, dessedentação animal, irrigação, uso industrial, navegação, recreação e aquicultura, estão relacionados com a contaminação dos mananciais por esgotos domésticos e industriais que afetam a qualidade desses recursos. Embora essas atividades variem de acordo com a população na bacia de drenagem e com a organização econômica e social da região, essas atividades geram impactos e deterioração da qualidade da água. Para minimizar essa problemática, na busca da preservação dos recursos naturais e da vida na Terra, pesquisas têm sido desenvolvidas visando dar suporte à aplicação de políticas públicas e de educação ambiental que melhor equacionem essa relação do homem com o seu biótopo. Além desses aspectos, o crescente aumento demográfico no planeta, reforça a necessidade da adoção de políticas de preservação dos seus recursos hídricos, para isto, se faz necessário o uso de técnicas alternativas, como o tratamento biológico

TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTE SECUNDÁRIO, USANDO A
MICROALGA *Chlorella sp.* IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE
CÁLCIO.

terciário das águas residuárias, por exemplo, com microalgas imobilizadas. Nesse contexto, a presente pesquisa consiste no tratamento de efluente secundário, através da microalga *Chlorella sp.* imobilizada em matriz de alginato de cálcio, objetivando produzir efluente de boa qualidade sanitária e baixa concentração de nutrientes.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar um sistema de tratamento terciário de esgotos, constituído de microalgas imobilizadas para a remoção de fósforo e coliformes termotolerantes, visando produzir efluente com qualidade sanitária para lançamento em corpos aquáticos.

2.2. Objetivos Específicos

I- Avaliar a eficiência de co-remoção de fósforo e coliformes termotolerantes com a microalga *Chlorella sp.* imobilizada em alginato de cálcio em bioreatores de 0,1L;

II- Investigar as condições operacionais em reatores tubulares, alimentados em regime de batelada intermitente, visando ter parâmetros para escalas maiores;

III- Investigar a concentração na qual a matriz de alginato é mais resistente e eficiente na remoção de fósforo e de coliformes termotolerantes.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Lagoas de Estabilização

As algas desempenham um papel fundamental no funcionamento do sistema de lagoas de estabilização no tratamento de esgotos, limitando a proliferação de coliformes e bactérias patogênicas e removem nutrientes da água através de seu metabolismo e crescimento celular, ocorrendo também a precipitação de sais de fósforo como estruvita e apatita. Entre as diversas formas de microrganismos existentes nas lagoas de estabilização, as algas verdes (*Chlorophyta*), são componentes significativos, especialmente as microalgas do gênero *Chlorella sp.*, que são microrganismos unicelulares, clorofilados e sem flagelos. Através de seu metabolismo, as algas atuam no funcionamento da lagoa de estabilização: aumentando a concentração de oxigênio dissolvido (OD) através da fotossíntese, o qual é necessário à fisiologia das bactérias aeróbias heterotróficas, consumindo o dióxido de carbono (CO₂) produzido pela oxidação bacteriana da matéria orgânica, elevando o pH do meio e removendo nutrientes da água através de seu crescimento celular.

3.1.1. Remoção de nutrientes e coliformes termotolerantes nos sistemas de lagoas de estabilização

A entrada de fósforo e nitrogênio nos corpos aquáticos é frequentemente relacionada com o aumento da comunidade fitoplanctônica e, portanto, com a elevação da biomassa, o que implica em alto consumo de oxigênio, a água pode ficar turva, diminuindo a velocidade de fotossíntese, mortandade das espécies aeróbias com liberação de compostos que podem prejudicar as populações vizinhas, determinando o processo de envelhecimento desse ecossistema. Nas águas doces superficiais, o teor em fosfatos tem de ser cuidadosamente controlado, na medida em que constitui o fator limitante primário do processo de eutrofização, crescimento exagerado de algas e de plantas aquáticas. Os fosfatos e nitrogênio são elementos

eutrofizantes em relação aos nutrientes contidos em uma massa de água, sendo sua monitoração, de grande interesse na prevenção do comprometimento da qualidade da água, no âmbito da gestão dos recursos hídricos. O material nitrogenado em águas residuárias se compõe principalmente de nitrogênio amoniacal e nitrogênio orgânico (incluindo uréia, aminoácidos e proteínas).

As bactérias patogênicas, bem como, os coliformes termotolerantes, são removidas em sistemas biológicos, principalmente pelo biofilme das algas e a irradiação solar. Isto ocorre através de vários mecanismos, tais como temperatura ambiental alta, luz ultravioleta, foto-oxidação, altos níveis de pH, lise e aderência à superfície celular das algas (PEARSON, 1986; DAVIES-COLLEY, 2005). Em vários trabalhos, o cultivo de algas tem sido utilizado e descrito na remoção de microrganismos patogênicos, através de diferentes mecanismos. Esses estudos demonstraram que existe um aumento na desinfecção em lagoas de estabilização sob condições de pH elevado (PEARSON, 1986; PEARSON et. al., 1987; DIXO et al., 1995; RANGEBY et al., 1996; DAVIS-COLLEY et al., 1997).

Os sistemas com algas imobilizadas são uma versão compacta das lagoas de estabilização, pois, com otimização de espaço, elevada concentração celular e tempo de contato significativamente menor, serão reproduzidas as condições ambientais para o tratamento terciário do efluente.

3.2. A biotecnologia e as aplicações dos sistemas imobilizados

A biotecnologia consiste na utilização de sistemas e de componentes celulares para a obtenção de produtos e para o desenvolvimento de processos industriais. Trata-se de um campo de trabalho multidisciplinar e que encontra aplicações em todos os setores importantes da Economia (BORZANI et al., 2001). A imobilização consiste na retenção de células ou enzimas em uma estrutura física insolúvel, o que as obriga a permanecerem em uma região particular do bioreator. A imobilização de microrganismos na forma de

biofilmes, flocos e pellets é um fenômeno comum na natureza (PRADELLA, 2001). Na maioria dos casos, a imobilização é benéfica para o microorganismo. Além de efeitos diretos positivos, tais como evitar ação de pastagem por zooplâncton agressivo (FAAFENG et al., 1994), redução da competição por nutrientes com outras espécies, registrando-se também as diversas melhorias no metabolismo, função e comportamento das microalgas. A fotossíntese em duas espécies de microalgas investigadas foi maior, em relação às células livres, sendo sua fase de senescência, significativamente retardada nas formas imobilizadas (SINGH, 2003). A Imobilização com quitosana, protege as paredes celulares de *Synechococcus sp.* contra a toxicidade NaOH. As células imobilizadas apresentaram melhor crescimento do que culturas de células livres (AGUILAR-MAY et al., 2007).

Um grande número de técnicas está disponível para a imobilização de enzimas ou células em uma variedade de suportes naturais e sintéticos. A escolha do suporte, assim como a técnica depende da natureza da enzima, a natureza do substrato e sua aplicação final. A aplicação de técnicas de imobilização de algas introduziu importantes vantagens nos processos biológicos de tratamentos de águas residuárias, apresentando eficiência significativa na remoção de nutrientes e no decaimento de coliformes termotolerantes, usando bioreatores com boa produtividade volumétrica, fácil operação e com a recuperação do produto para reuso do material em outros processos. O principal método utilizado é o de encapsulamento ou armadilha onde são usados polímeros naturais ou sintéticos, sendo os polímeros naturais, menos estáveis em águas residuárias, podendo dissolver-se em elevado grau de contaminação desses efluentes, estando também mais vulneráveis à degradação ambiental por microrganismos. Os polímeros sintéticos apresentam maior resistência ao rompimento, todavia, a difusividade é maior em polímeros naturais, destacando-se que estes promovem menor interferência no metabolismo da célula imobilizada. São descritos a seguir, seis grupos de métodos de imobilização: adsorção, floculação, ligação covalente, ligação cruzada, aprisionamento em membranas semipermeáveis e aprisionamento em gel.

3.2.1. Adsorção

A adsorção de um biocatalisador a um suporte macroscópico insolúvel em água é o método de imobilização mais simples e antigo. Muitos microrganismos têm uma tendência natural de aderir e se multiplicar sobre algumas superfícies e essa característica pode ser explorada para imobilizar células em materiais adsorventes. Madeira, serragem, carboximetilcelulose, dietil-aminoetil-celulose (DEAE-celulose), terra diatomácea, bentonita e alumina são bons exemplos de suportes para adsorção (FABER, 1995; MORENO-GARRIDO, 2008). Técnicas para a adesão de células inteiras em superfícies poliméricas estão ganhando uma importância considerável. Um dos problemas deste tipo de imobilização está relacionado com a formação e acúmulo de absorção de nutrientes resultante das condições não homogêneas do crescimento celular, pois produtos secretados para o meio extracelular têm sua difusão comprometida (XAVIER et al., 2003).

3.2.2. Flocculação

Na flocculação ocorre a agregação de células entre si. O processo pode ocorrer naturalmente ou ser artificialmente induzido com a adição de agentes flocculantes. A quitosana é o agente flocculante mais amplamente empregado. Consiste de um aminopolissacarídeo biodegradável formado por unidades de glicosamina que é obtida a partir da quitina do exoesqueleto de artrópodes. Os grupamentos amino conferem carga positiva, promovendo a capacidade de adsorver partículas carregadas negativamente. A prática da flocculação tem sido utilizada principalmente na indústria de bebidas, uma vez que a flocculação das células de *Saccharomyces cerevisiae* afeta positivamente o tempo da fermentação, facilita a remoção das células e contribui para o aumento da qualidade da cerveja. A fraca estabilidade dos flocos formados é o maior inconveniente do método, que pode ser minimizado com o aumento da

viscosidade do meio e com a presença de ânions fosfato (MORENO-GARRIDO, 2008).

3.2.3. Ligação covalente

Ligação covalente é uma técnica utilizada amplamente para a imobilização de enzimas, embora não seja uma boa técnica para a imobilização de células. Nesse método, suportes são funcionalizados para conter um grupamento químico responsável pela imobilização do biocatalisador. Os grupos funcionais extensivamente investigados são os amino, carboxila, e o grupo de compostos fenólicos de tirosina. As enzimas são covalentemente ligadas ao apoio através dos grupos funcionais das mesmas, que não são essenciais para a atividade catalítica. Muitas vezes, é aconselhável realizar a imobilização na presença de seu substrato ou um inibidor competitivo de modo a proteger o sítio ativo. A ligação covalente também deve ser otimizada de modo a não alterar a sua flexibilidade estrutural. A desvantagem deste método é a necessidade de condições drásticas de reação, a exemplo das altas temperaturas. Como regra geral, cerca de metade da atividade catalítica é perdida devido às mudanças estruturais da enzima. Na imobilização de células vivas, a ligação covalente pode causar danos à superfície celular (FABER, 1995). Há casos, no entanto, em que as células não necessitam estar vivas quando imobilizadas, devendo estar ativo somente o sistema enzimático envolvido na conversão bioquímica requerida.

3.2.4. Ligação cruzada

Na ligação cruzada, enzimas são ligadas umas às outras através de ligações covalentes, obtendo-se agregados insolúveis de alta massa molecular. As moléculas também podem ser ligadas entre si através de outras proteínas, como albumina. Os reagentes bifuncionais mais usados com este objetivo são o glutaraldeído, dimetiladipimidato, dimetilsuberimidato e diisocianato de hexametileno. As ligações são estabelecidas entre os grupamentos amina, sulfidríla e hidroxila. Os efeitos difusionais são importantes, já que boa parte

das enzimas está localizada no interior de uma complexa estrutura que impede o acesso ao substrato (FABER, 1995).

3.2.5. Aprisionamento em membranas semipermeáveis

Neste método, os biocatalisadores (células ou enzimas) são mantidos em uma região da solução, através de uma membrana semipermeável e com porosidade adequada. Existem no mercado membranas sintéticas de poliamida ou polietersulfona com porosidade que varia de 500 a 300 000 Daltons. Substrato e produtos atravessam livremente a membrana, mas os biocatalisadores ficam retidos. As limitações difusionais podem ser intensas, mas não há risco de desnaturação da enzima ou perda da viabilidade celular (FABER, 1995).

3.2.6. Aprisionamento em gel

A técnica consiste no confinamento físico de enzimas ou células em uma matriz polimérica formadora de gel. Pode ser realizado pelo uso de polímeros sintéticos (acrilamida, poliuretano), proteínas (gelatina, colágeno) ou polissacarídeos naturais (ágar, carragenan, alginato). O crescimento celular nestes tipos de imobilização celular depende da limitação imposta pela porosidade do material e do acúmulo de biomassa no interior da matriz. O aprisionamento em gel é o método mais utilizado para imobilização de células vivas (PRADELLA, 2001; MORENO-GARRIDO, 2008). O gel polissacarídeo mais comumente usado é o alginato. O alginato comercial é extraído de algas marrons, principalmente de espécies dos gêneros *Laminaria* e *Sargassum* e das espécies *Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum* e *Lesonia negrescens*. O gel de alginato não é tóxico, tem baixo custo, possui alta afinidade pela água e as células não sofrem variações físico-químicas extremas durante o processo de imobilização (MORENO-GARRIDO, 2008). Em estudo realizado por ANISHA e PREMA (2008) foram imobilizadas células de *Streptomyces griseoloalbus* em esferas de alginato de cálcio e conseguindo aumentar a produtividade da enzima galactosidase em comparação com o

Maria Célia Cavalcante de Paula e Silva (MCTA/CCT/UEPB).

TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTE SECUNDÁRIO, USANDO A MICROALGA *Chlorella sp.* IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE CÁLCIO.

emprego de células livres. Além disso, 75% da capacidade de produção da enzima foram mantidos após a reutilização das células imobilizadas em oito ciclos de fermentação em batelada. (LINS e LEÃO, 2002) utilizaram células de *Kluyveromyces marxianus* imobilizadas em alginato de cálcio para a obtenção de leite com baixo teor de lactose. A capacidade de conversão da lactose em etanol e CO_2 foi constante mesmo após 23 ciclos. É importante ressaltar a limitação de transferência de massa imposta aos processos de imobilização celular em géis, pois, geralmente, a quantidade de oxigênio que adentra às micro esferas do gel de carragenan é estimada na faixa de $0,08$ a $0,1\text{mm}^3$, enquanto que em géis de alginato, estes valores são um pouco maiores, entre $0,1$ a $0,16\text{mm}^3$ (OGBONNA et al., 2000). Como outras formas de materiais para imobilização por engaiolamento, o gel de álcool polivinílico (PVA-gel), é um promissor suporte sintético para aprisionamento de células. O PVA-gel não é tóxico, é de simples separação e apresenta boas propriedades mecânicas e de difusão. Segundo Wang et al. (2005) o mecanismo clássico de imobilização por engaiolamento é a mistura de células microbianas com um composto polimérico que apresente cargas negativas, a exemplo do alginato de sódio. Conforme está representado na Figura 1, essa mistura é gotejada em uma solução de CaCl_2 com íons Ca^{2+} , o qual promove a formação de ligações iônicas, que resultam na formação de um gel consistente e insolúvel denominado alginato de cálcio, o qual imobiliza o microrganismo.

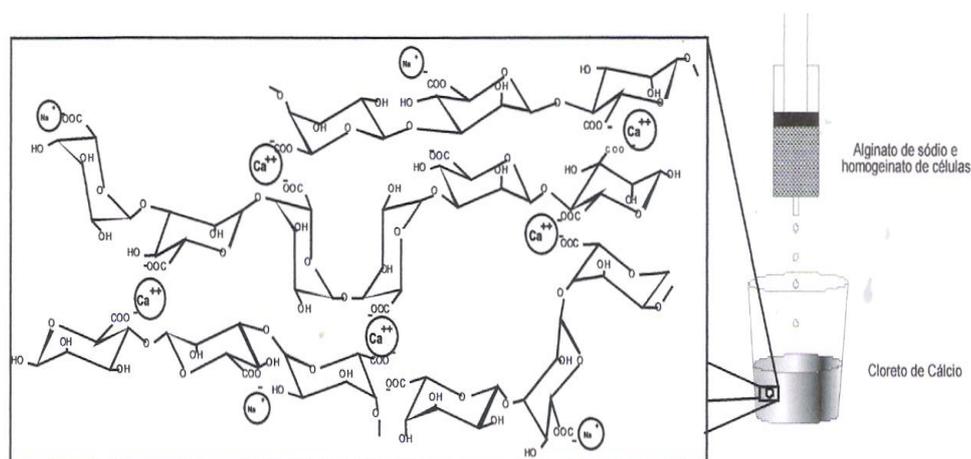


FIGURA 1: Formação do gel de alginato de cálcio por engaiolamento.

Fonte: Wang et al. (2005)

TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTE SECUNDÁRIO, USANDO A MICROALGA *Chlorella sp.* IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE CÁLCIO.

A geleificação do alginato é principalmente alcançada pela troca de íons por cátions divalentes, tais como Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} ou Mn^{2+} . A formação e as propriedades do gel de alginato de cálcio têm sido bastante estudadas. Existe uma vasta concordância que a rede de gel, induzida pela ligação do íon Ca^{2+} e pela cadeia de segmentos do grupo G, formam junções estáveis (uma rede tridimensional) consistindo nos principais dímeros, conforme a Figura 2 (ROY e GUPTA, 2004).

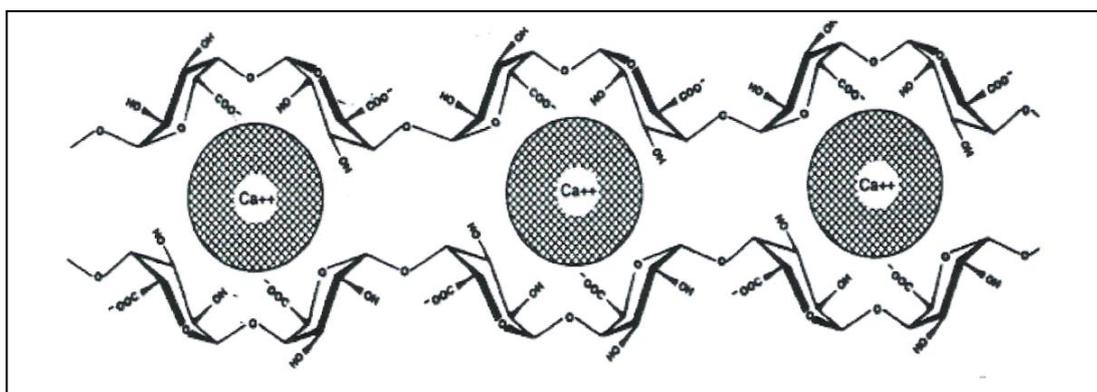


FIGURA 2: Modelo "Egg-Box", para a formação do gel de alginato com íons de cálcio.

Fonte: Rousseau et al. (2004).

3.3. A tecnologia de imobilização das microalgas em matriz de alginato de cálcio

A tecnologia do processo de imobilização de microalgas em matrizes de alginato surgiu como uma importante técnica para aumentar a longevidade fotossintética e biocatalizadora celular (ROBINSON et al., 1985; MEGHARAJ et al., 1992). Esta tecnologia não previne apenas que a biomassa seja levada para fora dos bioreatores, mas também oferece um grande avanço na flexibilidade operacional e na fácil separação das algas dos efluentes tratados (MALLICK e RAI, 1993). Vários trabalhos indicam remoção de bactérias entéricas patogênicas, coliformes termotolerantes, vírus, nitrogênio, fósforo, metais, biocidas e outros compostos químicos de afluentes contaminados, através de culturas de microalgas submetidas a fluxo contínuo ou não, bem como demonstraram uma significativa redução dos microrganismos patogênicos e

nutrientes nos bioreatores sob condições ideais (SIAN, 1984; MEGHHARAJ, 1992; LAU et al., 1997; TAM e WONG, 2000; DE-BASHAN et al., 2002).

O sucesso no empreendimento de imobilizar microalgas para o tratamento de águas residuárias depende de muitos fatores, incluindo a espécie algal, a matriz de imobilização, a concentração de células e esferas da matriz, a morfologia das esferas, aeração, tempo de retenção, e outros (LAU et al., 1997; TAM e WONG, 2000; DE-BASHAN et al., 2002). Pesquisas com microalgas marinhas e de água doce, apontam para as vantagens dos sistemas mistos de bactérias-algas imobilizadas para o tratamento de águas residuárias. Os investigadores têm recorrido à utilização de diversos meios de imobilização da *Chlorella vulgaris* imobilizada em meio de alginato de cálcio, proporcionando maior eficiência na remoção de fósforo. A imobilização de microalgas possibilita o confinamento de uma população ou de uma comunidade que, em condições ótimas, seu metabolismo, altera as condições do meio onde estão inseridas, promovendo o tratamento do efluente. Nos sistemas de imobilização com polímeros, semelhante aos sistemas de filtração biológica, existe uma separação física entre os microorganismos e os efluentes tratados. Os microrganismos são imobilizados vivos dentro do polímero, onde, os poros deste, são menores que os mesmos, enquanto o fluido atravessa a matriz mantendo seu metabolismo e eventual crescimento (COHEN, 2001).

3.4. A *Chlorella* sp.

O gênero *Chlorella* compõe a classe Chlorofíceas, família Chlorelaceae, ordem Chlorococcales (BDIGPELD - Biblioteca Digital Geodiferenciada). Estudos recentes, baseados em caracteres bioquímicos, fisiológicos e ultra estruturais, juntamente com a filogenia molecular ausente na sequência 18s RNA completa, têm sugerido que são quatro as espécies pertencentes ao gênero *Chlorella*: *C. vulgaris*, *C. iobophora*, *C. sorokiniana* e *C. kessleri*. Esse gênero é representado por microalgas verdes, unicelulares, que possuem clorofila e realizam fotossíntese, sendo uma das primeiras algas a serem isoladas como uma cultura pura realizada por Beijerinck na década de 1890.

As atenções científicas somente se voltaram para o potencial da *Chlorella sp.* no final de 1940, quando foram cultivadas em meio mineral definido, especificando-se as necessidades ambientais e nutricionais de cada espécie (HSIUAN et al., 2000). Segundo Megharaj et al. (1992) e Myers (1980), o gênero *Chlorella sp.* apresenta 5% de eficiência média na conversão de energia luminosa em material celular. E, mesmo em um meio pobre em nitrogênio, apresenta uma boa produção de biomassa, desde que em ambientes com temperatura elevada e boa luminosidade. As microalgas verdes (Chlorophyceae) contêm aproximadamente 10% de minerais, 44% de albumina, 12% de ácidos graxos, 32% de fibras totais e 2% de clorofila do peso seco (PANIANGUA, 2003).

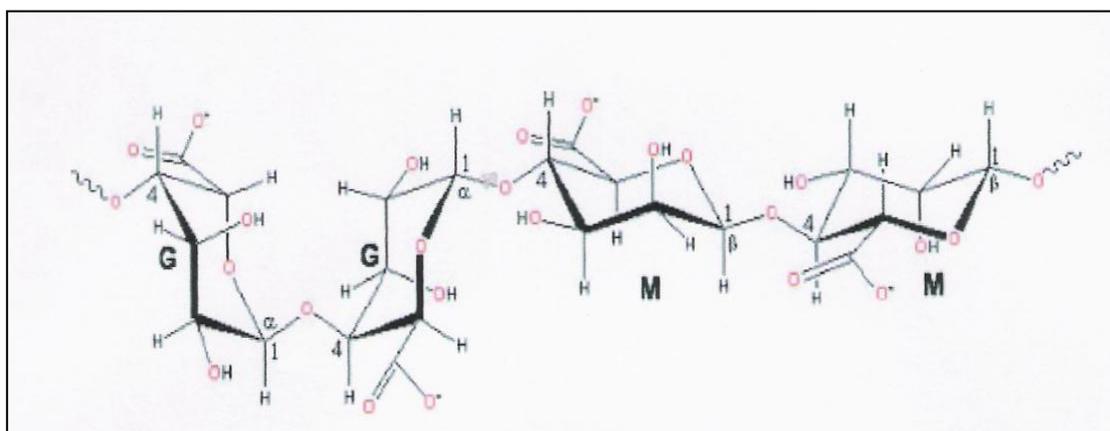
Bicudo e Menezes (2006) caracterizando a *Chlorella Beijerinck*, citam que são indivíduos sempre solitários e de vida livre, a célula é em geral, esférica, elipsoidal ou ovóide, mas também reniforme ou um pouco assimétrica, a parede celular é bem distinta, porém delgada. O cloroplastódio é único na maioria das vezes, sendo raro ocorrerem dois. Quando único, tem a forma de taça e quando em número de dois, cada um tem a forma de uma calota rasa e aberta. Pirenóide nem sempre presente.

Chlorella vulgaris é uma alga verde, eucariótica, autotrófica e unicelular, em condições normais de cultura, tipicamente tem o tamanho aproximadamente de uma hemácia, cerca de 5 e 6 μm de diâmetro (BORAAS et al., 1998). Em condições adversas, com dificuldades nutritivas, pode passar de sua forma normal unicelular à forma multicelular, formando pequenas colônias estáveis de oito células, característica esta, que é transmitida hereditariamente. Desta forma, consegue um diâmetro de cerca de 17 μm , o que lhe permite escapar de flagelados heterotróficos que se alimentam de partículas de dimensões aproximadas de *Chlorella vulgaris* unicelular (BORAAS et al., 1998). As microalgas mais comuns e efetivas na imobilização para a remoção de coliformes, nutrientes e metais, sendo também, tolerantes a amplas variações de pH e concentração de sais, são as espécies do gênero *Chlorella*. As células de *Chlorella* suportam concentrações de Mg e K até 10

vezes mais elevadas que as concentrações críticas e de P, S e Mn até 100 vezes mais. Quando imobilizadas na matriz de alginato de cálcio, as viabilidades celulares mantêm-se por um longo período de tempo e, ao contrário do que acontece nos sistemas de tratamento com algas livres suspensas, concentração muito elevada de algas na matriz diminui a eficiência do tratamento (MEGHARAJ et al., 1992; RAI, 1993; LALIBERTÉ et al., 1994; RANGEBY, 1996; LAU et al., 1997; TIEN, 2002).

3.5. Alginato: características e aspectos tecnológicos

O alginato é um polissacarídeo bioativo. Trata-se de um ficocolóide com ácido algínico como princípio ativo, que contém ferro e cálcio na sua estrutura. Em 1880, foi isolado por lixiviação por E. STANFORD e começou a ser comercializado em 1929. Desde então, prosperam suas aplicações, nas áreas médicas, farmacêuticas, alimentícias e odontológicas (SRIVASTAVA e KULSHRESHTHA, 1989). Segundo (GUO et al., 2006), o alginato é um polissacarídeo linear constituído por unidades de ácido manurônico ligado por ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4), e também por unidades de ácido gulurônico unidas por ligações do tipo α (1 \rightarrow 4). Esses resíduos estão arrançados na forma de blocos (M) e blocos (G), ligados de forma que a sequência destes resíduos na molécula sejam alternados. Segundo (CLEMENT et al., 1997), a molécula desse polímero é formada por blocos homopoliméricos M- e G- e por blocos heteropoliméricos MG (Figura 3).



TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTE SECUNDÁRIO, USANDO A MICROALGA *Chlorella sp.* IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE CÁLCIO.

FIGURA 3: Estrutura química do alginato- bloco heteropolimérico.

Fonte: Smidsrod et al. (1990)

O alginato é insolúvel em água à temperatura ambiente, tornando-se solúvel em temperaturas elevadas. Na concepção de BRUNETTON (1993), o ácido algínico é um polímero linear constituído por dois tipos de ácidos urônicos (monômeros): os ácidos manurônico e gulurônico, unidos através de ligação beta (conforme está apresentado na Figura 3), possui caráter aniônico acentuado que permite a formação de sais solúveis de sódio, potássio, amônio e insolúveis, de cálcio. Segundo (BRANDENBERG et al., 1998), o uso destes materiais no encapsulamento de células, permite aos microrganismos continuar a sobreviver numa matriz relativamente não tóxica, através da qual gases e líquidos podem se difundir, citam também que a matriz juntamente com os microrganismos, ajuda a diminuir a toxicidade do meio ambiente. Na Figura 4 é apresentada uma micrografia da estrutura interna de esfera de alginato de cálcio contendo microalgas *Chlorella sp.* imobilizadas.

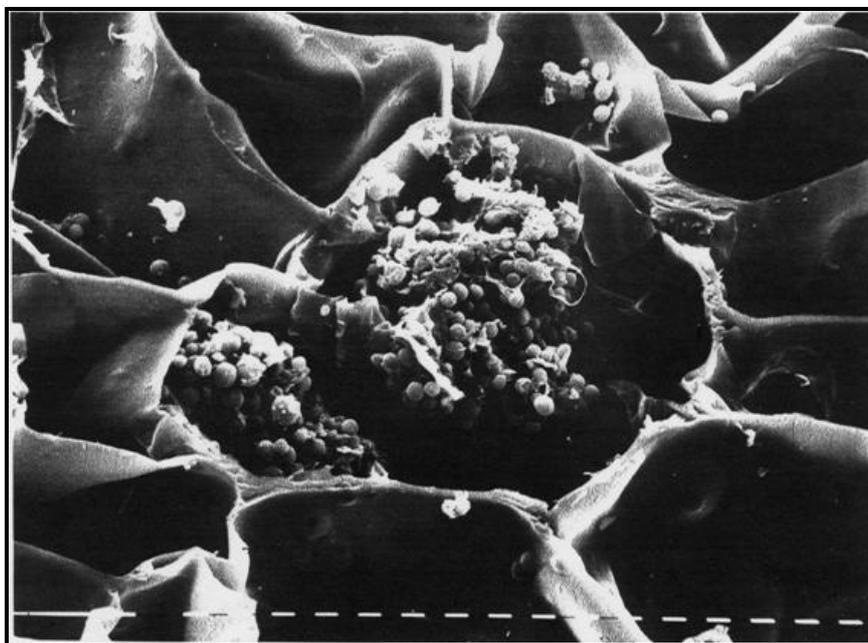


FIGURA 4: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da estrutura interna da esfera de alginato de cálcio com microalgas do gênero *Chlorella* imobilizadas (SIAN, 1984).

3.6. Remoção de fósforo de águas residuárias por meio de algas Imobilizadas

A utilização de algas imobilizadas tendo em vista a remoção de fósforo é uma metodologia muito atual. Esta sendo investigada, pois os resultados obtidos com o confinamento desses microrganismos são favoráveis à execução de uma boa gestão dos recursos hídricos. Elas assimilam o fósforo inorgânico para o seu metabolismo e através do processo fotossintético, favorecem as condições ambientais para que se desenvolvam outros mecanismos de remoção química, tais como a sorção e a precipitação do fosfato na matriz. É do conhecimento dos investigadores que alguns derivados dos produtos de microalgas, como é o caso dos alginatos, que possuem tendência para acumular fosfatos.

Na década de oitenta que LA NOÛE e os seus colaboradores aparecem como pioneiros na introdução da tecnologia da imobilização de algas para o tratamento de águas residuárias, nomeadamente na remoção de nitrogênio e fósforo (CHEVALIER e LA-NOÛE, 1985a). A partir de 1990, mais de 50% dos registos de estudos de algas referem o seu uso no tratamento de águas residuárias (SHINY et al., 2004). Estudos realizados relatam a utilização de *Chlorella vulgaris* imobilizada em matriz de alginato de cálcio, na remoção de nutrientes de águas residuárias domésticas. Esses estudos referem-se a uma eficiência na ordem de 100% na remoção de nitrogênio (N) e de 95% na remoção de fósforo. (TAM e WONG, 2000; LAU et al., 1998a e 1998b). Lau et al. (1997) estudando a remoção de fosfato usando *Chlorella vulgaris* obtiveram remoção de fosfato em torno de 38% em culturas livres e 94% pelas células imobilizadas em alginato de cálcio após 24 horas. Este fenómeno pode ser atribuído principalmente aos elevados valores de pH e da liberação de íons cálcio pelo polímero, provocando uma precipitação química de íons fosfato (TAM e WONG, 2000).

Considerando a relevância do emprego da tecnologia das algas imobilizadas no contexto de preservação dos recursos hídricos apontada em

TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTE SECUNDÁRIO, USANDO A
MICROALGA *Chlorella sp.* IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE
CÁLCIO.

literatura corrente, neste estudo, há a possibilidade de remoção simultânea, de fósforo e coliformes termotolerantes em bioreatores com algas imobilizadas para melhorar a qualidade do efluente antes do lançamento para o meio ambiente.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Localização do experimento

O trabalho foi realizado na Estação experimental de Tratamentos Biológicos de Esgotos Sanitários (EXTRABES) situada no Bairro do Tambor, numa área pertencente à Companhia de Água e Esgotos da Paraíba sob responsabilidade da Universidade Estadual da Paraíba, na cidade de Campina Grande – PB, com coordenadas geográficas de 7^o14'22''S e 35^o53'05''W e altitude de 550m.

4.2. Metodologia

Foram desenvolvidos alguns ensaios preliminares que deram suporte à realização da pesquisa, estes, serão descritos antes da caracterização e monitoração dos bioreatores.

4.2.1. ENSAIOS PRELIMINARES

4.2.1.1. Isolamento e cultivo da *Chlorella sp.* em Meio Basal Bold's

O crescimento de *Chlorella sp.* é estimulado em meio suplementado, portanto para o cultivo e manutenção do inóculo, foi utilizado o MBB- Meio Basal Bold's (BISCHOFF e BOLD, 1963; BOROWITZKA, 1988). Seus constituintes e concentrações/L estão descritos na tabela 01.

TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTE SECUNDÁRIO, USANDO A MICROALGA *Chlorella sp.* IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE CÁLCIO.

TABELA 1: Composição do meio de cultivo - Meio Basal Bold's (MBB) em mg. L⁻¹.

Nutrientes	mg/L
NaNO ₃	250
KH ₂ PO ₄	175
CaCl ₂ -2H ₂ O	25
MgSO ₄ -7H ₂ O	75
K ₂ HPO ₄	75
NaCl	2,5
EDTA	50
FeSO ₄ -7H ₂ O	4,98
H ₃ BO ₃	11,42
ZnSO ₄ -7H ₂ O	8,82
NaMoO ₃ -7H ₂ O	0,72
CaCl-6H ₂ O	0,38
MnCl ₂ -4H ₂ O	1,44
CaSO ₄ -5H ₂ O	1,57

As cepas de *Chlorella sp* foram isoladas de uma série de 4 lagoas rasas, cada uma com dimensões de 1m de largura, 5m de comprimento e 0,5m de profundidade que tratavam lixiviado oriundo de aterro sanitário com alta concentração nitrogênio amoniacal. Foram coletados e centrifugados em centrífuga Quimis, 100 mL de efluente da lagoa de estabilização. As algas concentradas foram inoculadas em tubos de ensaio pré-esterilizados contendo Meio Basal Bold's (MBB) com 2% de ágar, essas amostras foram mantidas em fotoperíodo de 24 horas, em sala de cultivo com temperatura controlada (27^oC) por termômetro laboratorial Term e refrigerador Cònsul multiair 7500, sob iluminação de lâmpadas fluorescentes de 40 watts. Passados 21(vinte e um) dias foi feita a identificação do gênero algal ao microscópio invertido da marca Oleman, sendo essa população algal repicada em novos tubos de MBB com

TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTE SECUNDÁRIO, USANDO A MICROALGA *Chlorella sp.* IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE CÁLCIO.

ágar a 2%. Aguardou-se 21(vinte e um) dias e as microalgas foram então inoculadas em 100 mL de MBB líquido e colocadas na mesa rotatória com 80 rev. min⁻¹ em frascos erlenmeyers de 250 mL. Três semanas após, todo o meio de cultivo foi centrifugado, sendo as algas concentradas em apenas 10 mL que foram adicionadas em 500 mL do MBB, e colocadas na câmara de cultivo, sob aeração em aerador Inalar modelo Compact por sete dias. O meio de cultivo algal foi inoculado em frascos erlenmeyers de 2000 mL, sendo 1600 mL de MBB líquido para 32 mL de amostra algal em final de fase logarítmica. Os procedimentos aqui descritos podem ser visualizados através da Figura 5.

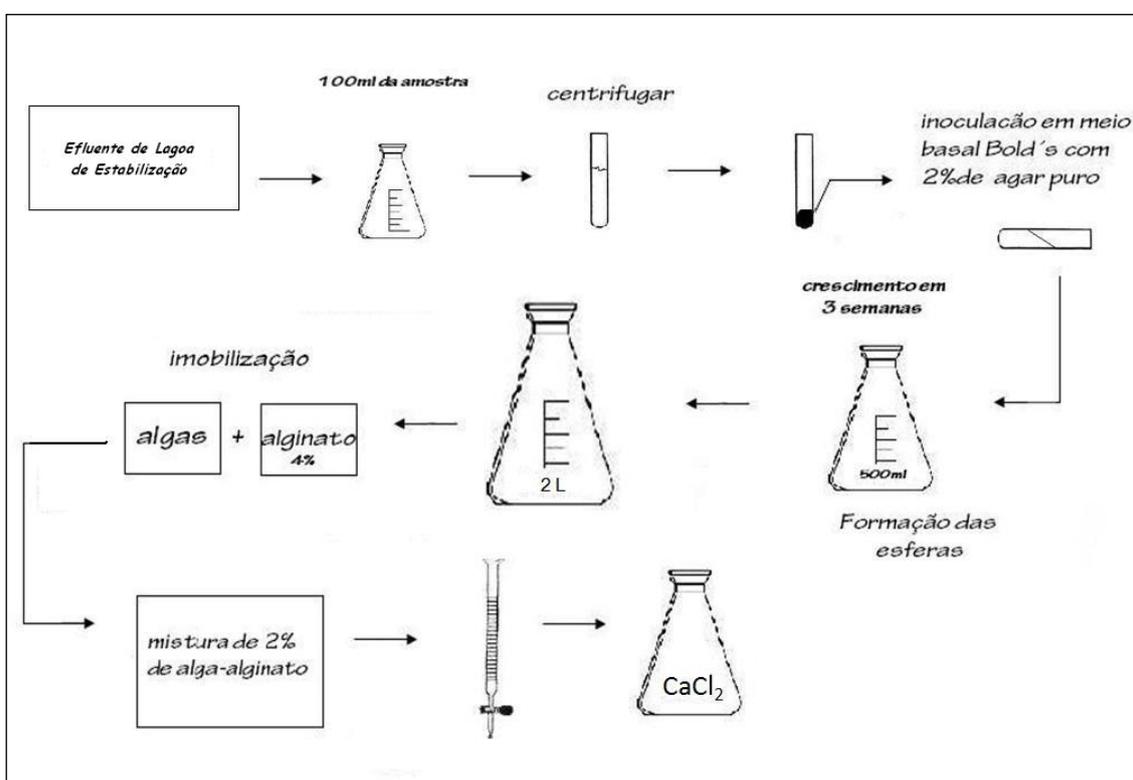


FIGURA 5: Esquema do isolamento, cultivo e imobilização da *Chlorella sp.*

4.2.1.2. A imobilização da *Chlorella sp.* em esferas de alginato

Foi medida a massa de 4, 6 e 8 gramas de alginato de sódio usando balança de precisão Bioprecisa FA2104N, cada amostra foi dissolvida em 100

TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTE SECUNDÁRIO, USANDO A MICROALGA *Chlorella sp.* IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE CÁLCIO.

mL de água destilada e, em seguida, realizou-se a esterilização em autoclave modelo Phoenix; por 15 minutos a 121⁰C. Foram obtidas três concentrações de alginato de sódio (4%,8% e 12%), durante vários experimentos. Paralelamente 4,4 g de cloreto de cálcio foram diluídos para 100 ml de água destilada, sendo esta solução (0,4M), em seguida autoclavada por 15 minutos a 121⁰C e utilizou-se na reação com o sedimento alga-alginato, para formação da esfera. Foram centrifugados 1000 mL de cultivo de *Chlorella sp.* a 3000 rpm e (FCR=950 g) durante 15 minutos, sendo o concentrado de microalgas misturado em alginato de sódio na proporção 1:1, para obter suspensões com concentrações finais de 2%, 4% e 6% de alginato.

Posteriormente essa suspensão alga-alginato, foi vertida de uma bureta de 50 mL em 400 mL de CaCl₂ a 0,4 M sob agitação de agitador Fanem Modelo 258, permanecendo nessas condições por 0,5 h para rigidez das esferas. No caso das esferas formadas sem algas (controle), 4g de alginato foram dissolvidas em 100 mL de água destilada, procedendo-se a imobilização conforme descrito anteriormente. Concluída a produção, as esferas foram lavadas em água destilada, e mantidas imersas nesse líquido, armazenadas na geladeira a 4⁰C no escuro, para posterior enchimento das colunas. Nas Figuras 6-a pode ser observada uma imagem de esferas com algas imobilizadas e na 6-b está representada a medição do diâmetro médio de uma esfera com algas imobilizadas.



FIGURA 6-a: Esferas com algas imobilizadas

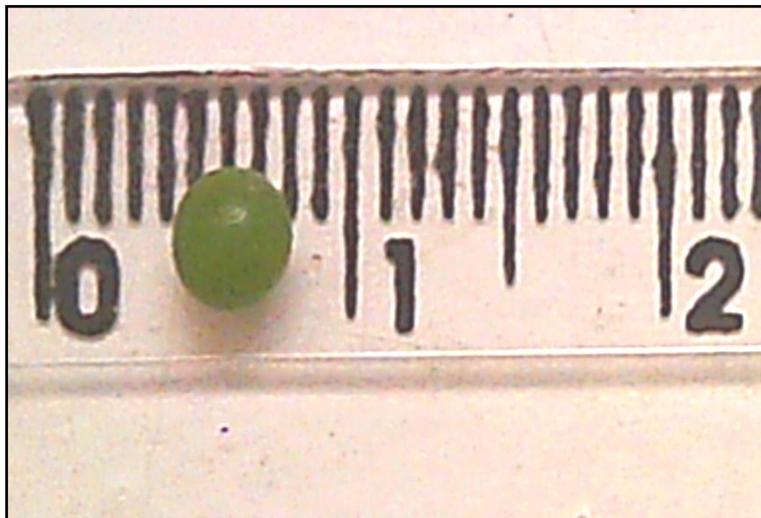


FIGURA 6-b: Diâmetro de esfera com algas imobilizadas

4.2.1.3. Medição das esferas

Anteriormente à realização do experimento, foram selecionadas aleatoriamente 100 esferas contendo algas imobilizadas e 100 esferas de alginato. Foi feita a medição do diâmetro de cada esfera, usando um paquímetro de aço. A medição foi realizada em 5 amostras com 100 esferas de diferentes imobilizações, onde foi registrada uma regularidade nos parâmetros matemáticos avaliados, principalmente para o diâmetro e a massa de cada esfera obtidos para cada esfera controle e com microalga imobilizada.

4.2.1.4. Crescimento e manutenção da cultura de *Chlorella sp.*

Para melhor compreensão do crescimento da *Chlorella sp.*, foi realizada uma curva de crescimento. O experimento foi realizado em triplicata; Para tanto, foram utilizados três frascos erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de MBB (Meio Basal Bold's), e 2 mL de cultura de *Chlorella sp.* em final de fase logarítmica. As amostras foram homogeneizadas, e destas, coletados 5 mL usando-se pipetas de Pasteur, esterilizadas, colocados em tubos de ensaio e levados para leitura (T_0) em câmara de Neubauer, usando-se microscópio

TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTE SECUNDÁRIO, USANDO A MICROALGA *Chlorella sp.* IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE CÁLCIO.

invertido modelo OLEMAN. Esse procedimento foi repetido após 24 horas da inoculação, e, a partir da terceira leitura, a cada 48 horas, sempre no mesmo horário do inóculo inicial. As culturas foram mantidas na sala de cultivo, com fotoperíodo de 24 horas e temperatura controlada de 27°C. Na Figura 7 estão representadas as culturas utilizadas na curva de crescimento.

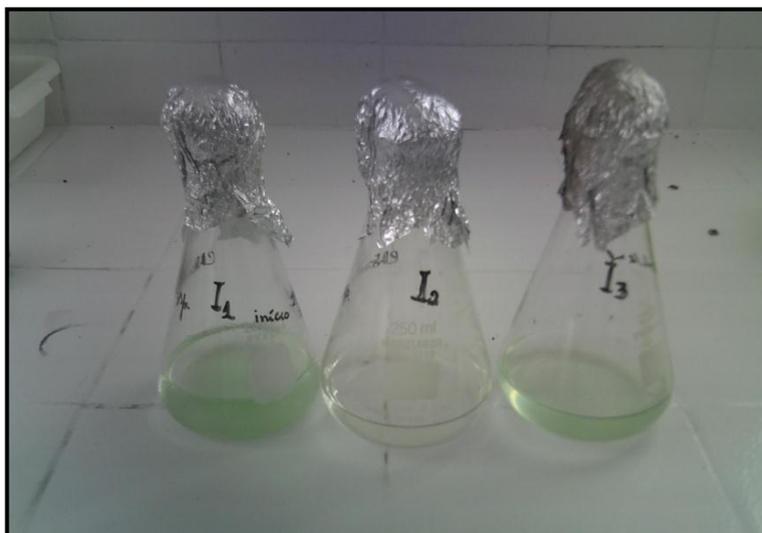


FIGURA 7: Culturas de *Chlorella sp.* após 72 horas de inoculação.

Para se determinar a concentração celular foram contadas todas as células dos blocos individuais maiores da câmara de Neubauer aplicados na Equação 1, segundo Tavares e Rocha (2003).

$$C \text{ (células/ mL)} = \text{contagem total} \times 10^4 / n^0 \text{ de blocos contados}$$

Equação 1

As cepas de *Chlorella sp.* utilizadas no experimento, cultura unialgal e não axênica, foram cultivadas em frascos erlenmeyers de 2L, contendo 1600 mL de Meio Basal Bold's. Os frascos foram inoculados com 32 mL de microalgas com 8 dias de cultivo, em final de fase logarítmica e iluminados por lâmpadas fluorescentes e com intensidade de fótons de aproximadamente 85 $\mu\text{E} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$. As culturas estoque foram preparadas em tubos de ensaio e armazenadas na geladeira a 4°C, no escuro. As amostras utilizadas para imobilização encontravam-se no final da fase logarítmica, na qual se registrou a presença de maior biomassa, conforme dados da curva de crescimento. Na

TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTE SECUNDÁRIO, USANDO A MICROALGA *Chlorella sp.* IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE CÁLCIO.

Figura 8 é apresentado o sistema autotrófico estacionário de cultivo da *Chlorella sp.* pronto para imobilização e na Figura 9, encontra-se uma fotomicrografia feita com câmera fotográfica digital SONY- Oleman de *Chlorella sp.* de cultura estoque, visualizada ao microscópio óptico invertido OLEMAN (A=400x).

Monitorou-se o pH, usando pHmetro Thecnal- Tec- 3 PM, do meio de cultivo em final de fase logarítmica durante 6 meses. Aferiu-se o pH de 60 amostras aleatórias (cinco por vez), coletadas a cada quinze dias.



FIGURA 8: Cultivo de *Chlorella sp.* pronto para imobilização.

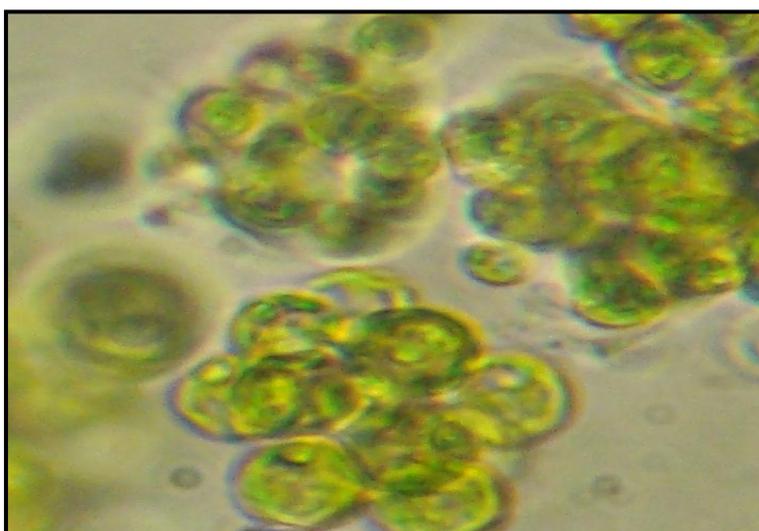


FIGURA 9: Fotomicrografia em microscópio óptico com *Chlorella sp.* (A=400x).

4.3. ENSAIOS CONCLUSIVOS

4.3.1. Caracterização dos bioreatores e das condições de realização do experimento

Durante o período experimental (junho a outubro de 2010), foram monitorados dez bioreatores tubulares de vidro pyrex transparente, em escala de laboratório. Destes, 6 (seis) de 0,1L de capacidade, tendo em cada um, uma torneira na parte inferior, 1 cm de leito fixo de fibra de vidro, e estando preenchidos por 0,06L de esferas, aproximadamente $1,146 \times 10^3$ (19 esferas/mL de efluente). Também foram monitorados, 4 (quatro) bioreatores com capacidade de 1,0L, cada um apresentava 1,5 m de comprimento, 30 mm de diâmetro, possuindo 3 cm de fibra de vidro sob o material suporte e duas torneiras, situadas em suas extremidades. Cada tubo, preenchido com 0,7L de esferas com algas imobilizadas, aproximadamente $1,2619 \times 10^4$ esferas (18 esferas/mL), com diferentes concentrações finais de alginato em suspensão (2%, 4% e 6%), estando conectado a uma bomba de pulso, modelo DHX MA/AD, através de uma mangueira de silicone de 40 cm, por sua extremidade inferior. O regime de alimentação para todos os reatores foi em batelada intermitente com tempo de contato de 3 e 5 horas para avaliar a remoção de fósforo e 6 horas para avaliar o decaimento de coliformes termotolerantes.

Para os bioreatores de 0,1 L (Etapa I-A), o ensaio era iniciado com a coleta de 100 mL de afluente no tanque séptico seguida da separação da amostra T_0 e posterior alimentação dos sistemas pela extremidade superior. Durante 6 horas coletou-se uma amostra de 10 mL pela torneira a cada tempo de contato de 1 h, aferiu-se o pH e a amostra foi acondicionada para realização, no mesmo dia, de análise bacteriológica e química. Após finalização do experimento, as lâmpadas eram apagadas e os bioreatores foram preenchidos por água destilada, deixando as esferas imersas, até a realização do próximo ensaio. Esse procedimento foi repetido na etapa I-B. As alterações implementadas, assim como as características operacionais das três etapas estão apresentadas na Tabela 1, cujos detalhes são descritos em seguida.

TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTE SECUNDÁRIO, USANDO A MICROALGA *Chlorella sp.* IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE CÁLCIO.

TABELA 2: Principais características operacionais da realização dos ensaios

Caracterização	Etapa I		Etapa II	Etapa III
	Etapa I-a	Etapa I-B		
Volume do bioreator	0,1 litro	0,1 litro	1 litro	1 litro
Origem do efluente	Tanque séptico	Filtro de areia	Filtro de areia	Filtro de areia
Regime de alimentação	Batelada intermitente	Batelada intermitente	Batelada intermitente	Batelada intermitente
Quantidade de esferas	1 146 unidades	1 146 unidades	12 619 unidades	12 619 unidades
Amostra coletada para análise	10 ml	10 ml	80 ml	80 ml
Número de bioreatores	2 (dois)	4 (quatro)	2 (dois)	2 (dois)
Parâmetros avaliados	Fósforo/ Coliformes/ pH	Fósforo	Fósforo	Fósforo/ pH
Volume líquido no bioreator	60 ml	60 ml	500 ml	500 ml

4.3.2. Etapas da monitoração dos bioreatores

4.3.2.1. Etapa I-A: Os bioreatores foram alimentados pela parte superior com efluente do tanque séptico, que apresentava concentração média de coliformes termotolerantes de 10^6 UFC/100mL e a concentração média de fósforo de 4,5 mg.P/L. A temperatura foi controlada (27°C) e a cada uma hora de contato, 10mL de efluentes tratados foram coletados para análise química (fósforo) com leitura em espectrofotômetro modelo Coleman 33D e bacteriológica (coliformes termotolerantes). Na Figura 10 estão representados respectivos bioreatores dessa etapa.

TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTE SECUNDÁRIO, USANDO A MICROALGA *Chlorella sp.* IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE CÁLCIO.



FIGURA 10: Bioreatores- Etapa I-A, microalgas e controle.

4.3.2.2. Etapa I-B: Foram instalados quatro bioreatores, um com esferas de alginato (controle) e os reatores 2, 3 e 4 preenchidos com esferas contendo a *Chlorella sp.* imobilizada nas respectivas concentrações de alginato (2%, 4% e 6%), alimentados pela parte superior com efluente que apresentava concentrações médias de fósforo em torno de 5,33 mg P/L. A temperatura foi controlada (27⁰C) e após cada tempo de contato, 10mL de efluente tratado foram coletados para análise química. Os experimentos foram realizados em triplicata. Na Figura 11 estão apresentados, em sequência, os bioreatores controle, 2%, 4% e 6% (concentração final de alginato).

TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTE SECUNDÁRIO, USANDO A MICROALGA *Chlorella sp.* IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE CÁLCIO.



FIGURA 11: Bioreatores- Etapa I-B, controle, 2%, 4% e 6%

4.3.2.3. Etapa II: Os bioreatores foram alimentados com 500 mL de efluente secundário com concentração média de fósforos em torno de 6,3 mg P/L, com temperatura foi controlada (27⁰C). Os bioreatores foram alimentados pela abertura inferior usando bombas de pulso e a cada tempo de contato, 80 mL de efluente tratado foram coletados para análise química. Os experimentos foram realizados em triplicata. Na Figura 12 estão representados os bioreatores com microalgas imobilizadas e controle (esferas de alginato), alimentados e prontos para a realização do ensaio.

TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTE SECUNDÁRIO, USANDO A MICROALGA *Chlorella sp.* IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE CÁLCIO.



FIGURA 12: Bioreatores- Etapa II, microalgas e controle

4.3.2.4. Etapa III: Um dos bioreatores foi estruturado com microalgas imobilizadas com alginato a 4% em suspensão enquanto que no outro, as esferas foram produzidas com alginato a 6% em suspensão. A alimentação foi realizada pela abertura superior sem uso de bomba e a concentração média de fósforo afluente entre 5,33 mg.P/L e 10,82 mg.P/L. Na Figura 13 estão representados os bioreatores com algas imobilizadas em concentrações de alginato a 4% e 6%.

TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTE SECUNDÁRIO, USANDO A MICROALGA *Chlorella sp.* IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE CÁLCIO.



FIGURA 13: Bioreatores- Etapa III, 4% e 6%

4.3.2.5 Métodos analíticos

Na Tabela 3 estão apresentados os parâmetros avaliados e métodos analíticos adotados na pesquisa.

TABELA 3: Parâmetros avaliados e métodos analíticos adotados.

Parâmetro	Metodologia	Referência
pH	Padrões 4,7 e 9,0 para calibração e leitura	APHA, 1998
Fósforo total	Colorimétrico com ácido ascórbico	APHA, 1998
Orto-fosfato	Colorimétrico com ácido ascórbico	APHA, 1998
Coliformes termotolerantes	Técnica de membrana filtrante	APHA, 1998

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados do trabalho experimental. Estes foram divididos em duas partes. Inicialmente, são expostos os resultados obtidos dos experimentos preliminares, realizados objetivando dar suporte teórico para melhor compreensão do metabolismo das microalgas. Em seguida são apresentados e discutidos os resultados dos experimentos conclusivos, obtidos da monitoração dos bioreatores.

5.1. EXPERIMENTOS PRELIMINARES

5.1.1. Medição das esferas

Conforme a Figura 14, 77% das esferas medidas, apresentaram um diâmetro médio de 4 mm, área de 25 mm², massa de 0,371g e volume de 33,51 mm³. Marcon (2005) e Silva (2007), trabalhando com *Chlorella sp.* imobilizada em matriz de alginato de cálcio, obtiveram resultados semelhantes para o diâmetro.

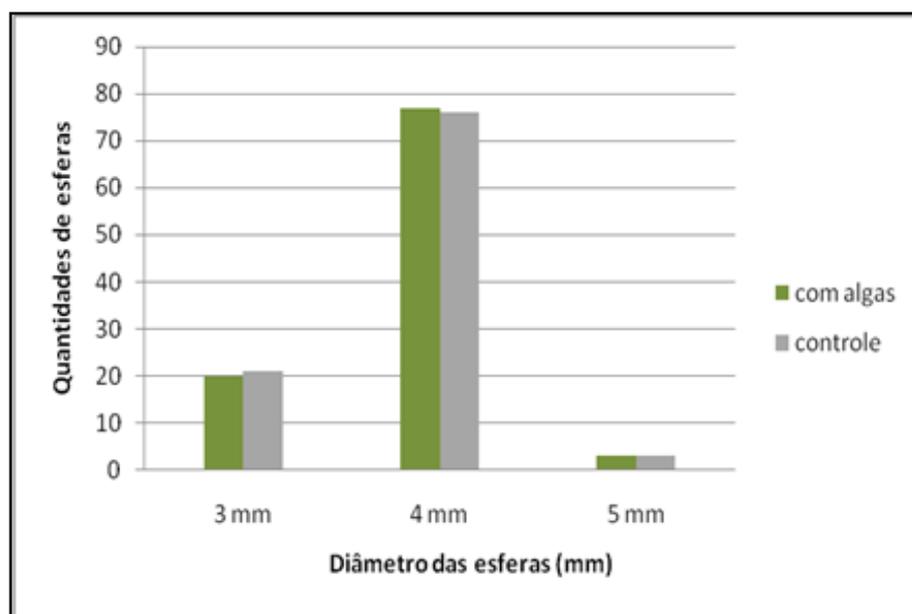


FIGURA 14: Diâmetro das esferas antes da montagem do experimento (mm)

5.1.2. O pH do meio de cultivo

O pH é um parâmetro importante que exerce influência fisiológica e controla o crescimento microalgal. Estudos de Mayo e Noike (1994), sobre efeito da concentração de íons de hidrogênio no crescimento da *Chlorella vulgaris* revelaram a preferência pelo pH 8,0. No estudo desenvolvido por Silva (2006), o crescimento de *Chlorella vulgaris* em MBB foi eficiente em pH de 6,8 a 8,8. Os resultados de pH do meio de cultivo obtidos neste trabalho, oscilaram entre 8,6 e 11,34, tendo como valor médio 10,5. Os elevados valores registrados indicam a pequena concentração de CO₂ no meio, pois, sendo o sistema em batelada, após a suspensão da aeração, ao sétimo dia de inoculação, as algas absorveram grande parte do CO₂ livre, resultando na sua liberação a partir dos íons bicarbonato (HCO₃⁻), com conseqüente aumento do pH devido à liberação simultânea de hidroxilas (OH⁻).

5.1.3. Curva de crescimento da *Chlorella sp.*

Com o objetivo de identificar o tempo necessário para que a *Chlorella sp.* atingisse a fase logarítmica, as melhores condições de crescimento, bem como fatores que podem gerar interferência na cultura, a exemplo da exaustão de nutrientes (nitrato, fosfato e ferro), a diminuição de CO₂ ou O₂ no meio, os valores de pH, foi realizada uma curva de crescimento com período de 312 horas. Os valores médios de cada triplicata estão apresentados na Figura 15.

TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTE SECUNDÁRIO, USANDO A MICROALGA *Chlorella sp.* IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE CÁLCIO.

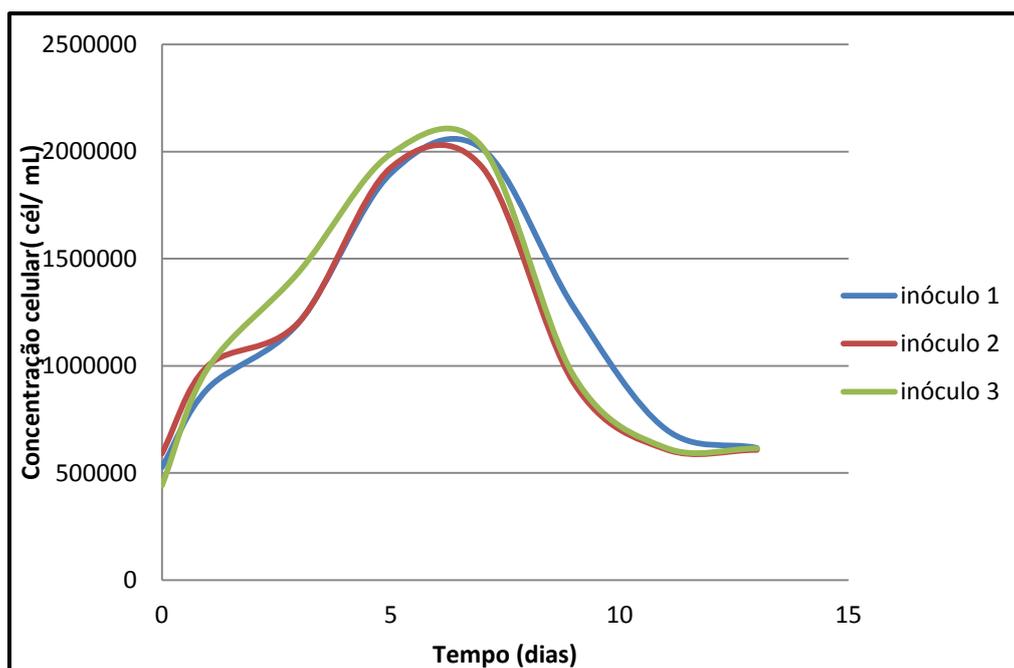


FIGURA 15: Curva de crescimento, em triplicata, de *Chlorella sp.*

Os valores de crescimento celular registrados com 24 horas de inoculação indicaram boa viabilidade celular, recebendo um incremento de aproximadamente $4,4 \times 10^4$ células/mL, em torno de 45%. Esse resultado pode ser explicado pelo fato da amostra utilizada na inoculação estar em fase logarítmica (exponencial), onde o meio estava com ampla disponibilidade de nutrientes, não requerendo da célula maior fase de aclimação. Conforme a Figura 15, a partir do 5º dia foram atingidos valores médios de $1,28 \times 10^6$ células/mL, revelando estar na fase logarítmica. A DCM (densidade celular máxima) foi atingida no término da primeira semana. Resultados semelhantes foram obtidos por (GARCÍA-GONZÁLES et al., 2005). A fase de declínio teve início aproximadamente no 8º dia de cultivo, os valores médios sofreram uma redução de $1,98 \times 10^6$ para $1,04 \times 10^6$. Os resultados indicam que em condições controladas, em regime de batelada e sem aeração, a *Chlorella sp.* deve ser imobilizada entre o 5º e o 6º dia, onde sua velocidade de crescimento é máxima.

5.1.4. Crescimento da *Chlorella sp.* no interior da esfera

Objetivando avaliar a influência da luz e da aeração no crescimento da *Chlorella sp.* imobilizada na matriz de alginato de cálcio, foram colocados em batelada e sem aeração, 60 mL de esferas em 200mL de Meio Basal Bold em frascos erlenmeyer de 500 mL fechado com algodão e com lacre de papel alumínio . As algas imobilizadas estavam com 60 dias de imobilização, conservadas imersas em água destilada a 4^oC. A amostra foi submetida a fotoperíodo de 24 h e temperatura controlada de 27^oC. Passados 10 dias, foi registrado que aproximadamente 20% da amostra apresentavam coloração branca ou amarelada, sugerindo morte celular. Segundo Hirayama et al. (1996), o excesso de luz também pode provocar efeito letal nas células pela formação do peróxido de hidrogênio, substância tóxica para a microalga. Na presença do oxigênio, tal reação é denominada de foto-oxidação ou morte oxidativa.

Segundo Trevan e Mak (1988), a *Chlorella sp.* imobilizada em alginato de cálcio tende a formar pequenas colônias (8-30 células), a partir do gel imobilizado. Estudos de microscopia eletrônica em *Chlorella sp.* imobilizada, indicam que o crescimento das células fica muito restrito à periferia dos grânulos (DAY e CODD, 1985; RODRIGUES et al., 1986), outros trabalhos têm demonstrado que este é um resultado da limitação de dióxido de carbono dentro da matriz (ROBINSON et al., 1986). Robinson et al. (1985) constataram que a média frequência respiratória de *Chlorella sp.* imobilizada é menor do que a de células livres, pois a densidade de células provoca efeitos sobre a taxa respiratória média. Eles sugerem que apenas uma parte da células imobilizadas nas esferas estava metabolicamente ativa.

5.1.5. Indicações de desestruturação do material suporte

Após 28 dias de operação em batelada com efluente secundário e realização de 5 ensaios, o material suporte (alginato de cálcio) dos bioreatores de volume 1,0L, que estavam preenchidos aproximadamente 12500 esferas,

TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTE SECUNDÁRIO, USANDO A MICROALGA *Chlorella sp.* IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE CÁLCIO.

apresentou sinais de desestruturação, dificultando a passagem do efluente na coleta, tornando seu efluente esverdeado, indicando que houve liberação de algas da matriz. Os bioreatores foram desmontados, foi coletada uma amostra de 50 esferas de cada um deles e procedida a medição de cada esfera usando-se um paquímetro. As esferas que na montagem do bioreator apresentavam tamanho médio de 4 mm estavam alteradas. O resultado da nova medição das esferas de alginato após a desestruturação está exposto na Figura 16.

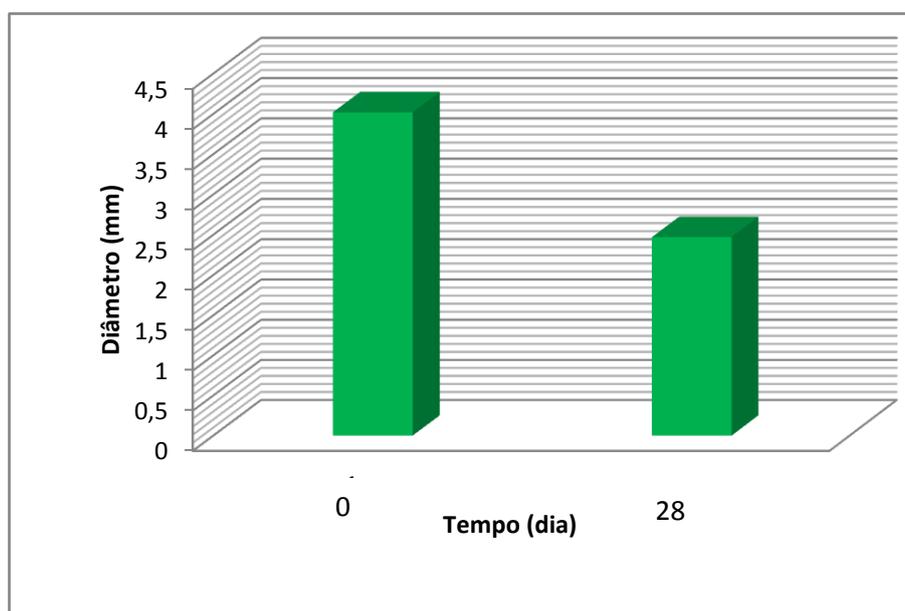


FIGURA 16: Resultados da medição de diâmetro de 50 esferas com microalgas imobilizadas (mm).

Conforme dados apresentados na Figura 16, o diâmetro médio das esferas com algas imobilizadas em concentração de 2% de alginato em suspensão, que inicialmente (T_0) apresentaram 4 mm de diâmetro médio, apresentaram após 28 dias, diâmetro médio de 2,47 mm, expressando um percentual médio de desgaste de 38,25%, com desvio padrão de 5%. Uma hipótese possível é que a grande massa de esferas da parte superior do bioreator exerceu pressão sobre as esferas da camada inferior, deformando-as, desencadeando alterações na morfologia (desgaste), associado às reações bioquímicas que provavelmente ocorreram entre os componentes da matriz de alginato e o fósforo presente no efluente, visto que, segundo alguns autores (LAU et al., 1998), devido à sua natureza ionotrópica, a estabilidade mecânica

do gel de alginato depende essencialmente das condições iônicas do ambiente. Como resultado, a integridade do gel é altamente vulnerável à presença de agentes como, por exemplo, fósforo e citrato. Esses tipos de agentes, quando ligados a cátions de Ca^{2+} , soltam a matriz de gel, que acaba por se dissolver, causando a perda de células alterando a experiência (ROBINSON et al., 1986). Corroborando com esse resultado, Lau et al., (1997) relataram que as concentrações de cálcio encontradas em águas residuárias de bioreatores contendo esferas de alginato, aumentaram consideravelmente após a realização do experimento.

Algumas vezes, quando da realização do experimento, foi observado que o bioreator estava obstruído, impedindo a passagem do efluente durante a coleta da amostra. O bioreator foi retirado do suporte de alumínio, suas esferas foram agitadas ao longo do mesmo para se descompactarem umas das outras, isso, pode ter liberado para o efluente, o fósforo adsorvido em experimentos anteriores, alterando o resultado final do ensaio. Segundo Kaya e Picard (1995), o atrito entre as esferas pode comprometer a capacidade de remoção de fosfato da água residuária pela microalga. Foram analisadas as diferenças percentuais de desgaste entre as esferas controle e as esferas com algas imobilizadas, que submetidas às mesmas condições apresentaram expressiva diferença no percentual de desgaste. As esferas controle sofreram um percentual médio de desgaste de 10,4% com desvio padrão de 2%. Essa diferença provavelmente está relacionada à concentração do alginato, que, nas esferas controle encontra-se na concentração de 4% e nas esferas com microalgas na concentração de 2%.

5.1.6. Longevidade das algas imobilizadas

Uma amostra de 60 esferas com algas imobilizadas foi mantida em temperatura ambiente (23°C) em ausência de qualquer meio líquido, com fotoperíodo de 8 horas por 14 meses. Ao serem avaliadas apresentaram coloração alaranjada, desidratação avançada e morfologia irregular. Ao serem imersas em 50 mL de MBB e submetidas à iluminação 24 h e temperatura de

27°C, após seis dias apresentaram coloração verde escura, indicando atividade algal. Mantidas nessas condições, 12 (doze) dias após, a matriz começou a apresentar desagregação. No 16º dia foi observado que o MBB (Meio Basal Bold's) apresentou aspecto turvo esverdeado, indicando desestruturação avançada do alginato. A elevada concentração de fósforo constituinte do Meio Basal Bold's, provavelmente gerou o rompimento do polímero de alginato.

Os resultados obtidos indicam que as algas imobilizadas, mesmo em condições adversas de ausência total de nutrientes, podem reduzir seu metabolismo. Segundo (MERCHANT et al., 2002), uma particular propriedade da *Chlorella sp.* é o seu nutriente chamado CGF (Chlorella Growth Factor). O CGF é composto principalmente de um complexo de nucleotídeo-peptídeo, encontrado no núcleo da célula, que é excelente para a manutenção e rejuvenescimento da mesma. Nas Figuras 17-a e 17-b está representada a amostra de esferas com algas imobilizadas 3 e 7 dias respectivamente, após imersão no MBB (Meio Basal Bold's).

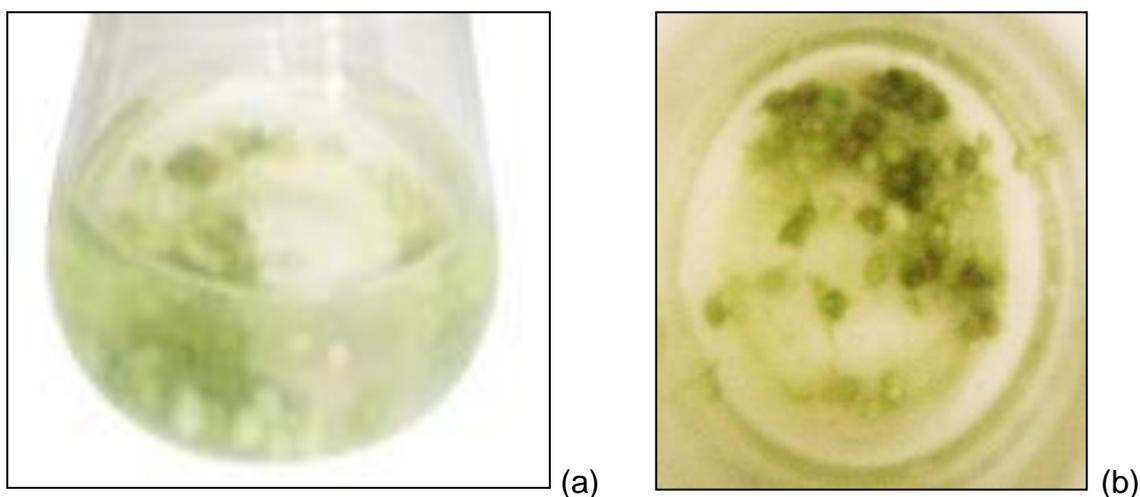


FIGURA 17: (a) esferas após 3 dias de imersão no MBB e (b) esferas com 7 dias de imersão no MBB.

Vários estudos têm demonstrado a viabilidade do uso de algas imobilizadas após armazenamento de longo prazo. Tamponnet et al. (1985) relataram que a imobilização de *Euglena gracilis* em esferas de alginato, foi mantida por mais de dois anos sem interferência significativa na fisiologia celular. Faafeng et al. (1994) relataram que, algas imobilizadas quando

Maria Célia Cavalcante de Paula e Silva (MCTA/CCT/UEPB).

armazenadas em temperatura baixa (4°C) no escuro, podem retomar o crescimento normal depois de mais de 12 meses de imobilização. Romo e Martinez (1997) imobilizaram a cianobactéria, *Pseudanabaena gateata* em esferas de alginato por longo tempo, as células tiveram seu metabolismo conservado. Estudos de Yean-Chang (2001) com a microalga verde *Scenedesmus quadricauda* cultivada e imobilizada em grânulos de alginato foram armazenadas a 4^o C em escuridão absoluta. As células demonstraram que mesmo tendo sido submetidas às condições descritas, mantiveram suas atividades fisiológicas. Células de *Chlorella vulgaris* mobilizadas apresentaram suas atividades fisiológicas preservadas após armazenadas na geladeira, em condição de escuro por 1(um) ano (ABDEL HAMEED, 2005 e NOWACK et al., 2005). Resultados similares foram obtidos neste trabalho, a partir de uma amostra de 600 mL de esferas com algas imobilizadas, acondicionada imersa em água destilada, na geladeira a 4^o C e no escuro por um período de 18 meses. Ao serem avaliadas foi constatado que conservaram a integridade física da matriz de alginato e a coloração verde, sugerindo da fisiologia celular preservada.

5.2. EXPERIMENTOS CONCLUSIVOS (Monitoração dos bioreatores)

5.2.1. Caracterização do efluente

Na Tabela 4 estão apresentados os valores das concentrações médias dos parâmetros físicos, químicos e microbiológicos analisados do efluente do tanque séptico (TS), utilizado na alimentação do sistema na Etapa I-A, e do efluente do filtro de areia (FA), tratado pelas microalgas nas etapas I-B, II e III. As análises dos parâmetros foram realizadas semanalmente, durante o período de junho a outubro de 2010 e seguiram os métodos preconizados por APHA, (1998).

TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTE SECUNDÁRIO, USANDO A MICROALGA *Chlorella sp.* IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE CÁLCIO.

TABELA 4: Caracterização do efluente utilizado para alimentar os bioreatores.

PARÂMETROS	TS	DESVPAD	FA	DESVPAD
DQO (mg/L)	214	130,6	103	93,1
pH	7,79	0,39	7,34	0,55
Fósforo total (mg P/L)	7,3	3,44	6,5	2,96
Ortofosfato solúvel (mg.P-PO ₄ ³⁻ /L)	4,3	1,39	2,9	0,76
Turbidez (UT)	46,06	11,9	3,67	0,98
Temperatura (°C)	23,4	3,2	23,9	3,6
SST (mg/L)	50	12	18	7
Condutividade (dS/m)	1,723	0,9	1,531	0,9
Coliformes termotolerantes (UFC/100mL)	2,7 x10 ⁶	-	2,5 x10 ⁴	-
Ovos de Helmintos	114,8	5,99	0	0
Alcalinidade (mgCaCO ₃ /L)	334,76	71,8	83,9	47,07
Nitrito (mg N-NO ₂ ⁻ /L)	0,17	0,03	0,07	0,02
Nitrato (mg N-NO ₃ ⁻ /L)	4,00	0,74	31,11	7,72
Amoniacal (mg N-NH ₄ ⁺ /L)	35	14,2	14	6,57
NTK (mg N-NTK /L)	40,78	9,5	14,36	9,71

5.2.2. ETAPA I-A (Bioreatores de 0,1L alimentados com efluente do tanque séptico)

5.2.2.1. Análise de pH

O potencial hidrogeniônico (pH) foi medido no bioreator com algas imobilizadas e no reator controle. A cada hora foi coletada uma amostra de 10 ml de ambos os reatores e medido seu pH, no reator controle (sem algas) a variação de pH a cada hora foi de 0,085, enquanto que a do reator com algas

TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTE SECUNDÁRIO, USANDO A MICROALGA *Chlorella sp.* IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE CÁLCIO.

foi de 0,6. Em ambos os reatores o pH médio inicial foi de 7,28 havendo, após 5 horas, um incremento no reator controle para 7,77 e no reator com algas *Chlorella sp.* para 10,63, indicando que o metabolismo desses organismos tem uma ação significativa no aumento do pH. Na Figura 18 estão representados os valores médios de pH dos bioreatores controle e com microalgas imobilizadas.

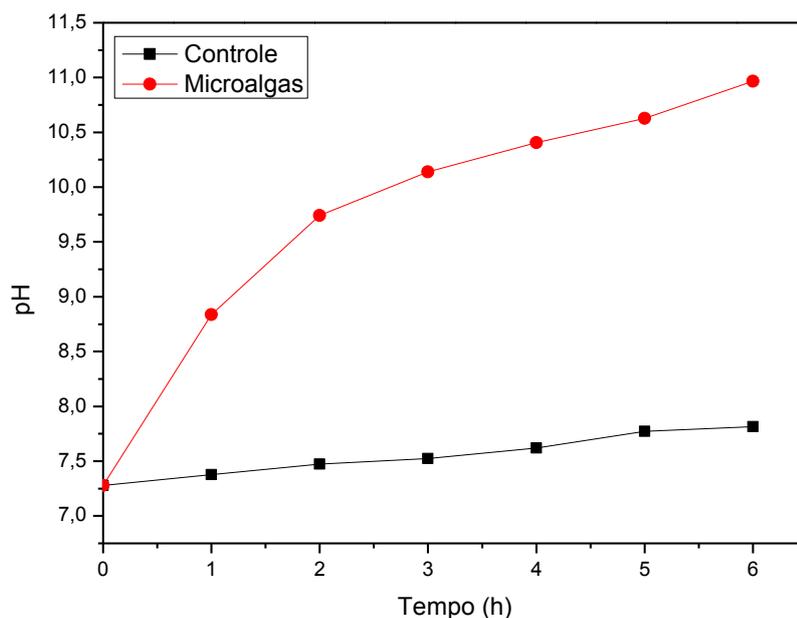


FIGURA 18: Valores médios de pH dos reatores controle e com algas imobilizadas

A alteração crescente dos valores de pH registrada ao longo do perfil de 6 horas, apresentado na Figura 18, indica que as condições do meio foram favoráveis para que as algas realizassem fotossíntese. Desta forma, confirma-se e ressalta-se o dinâmico e importante papel das microalgas verdes imobilizadas na alteração do meio, promovendo o tratamento terciário do efluente.

5.2.2.2. Remoção de fósforo

O fósforo presente nos efluentes é composto de fósforo orgânico e em sua maior fração por fosfatos. A remoção de fósforo nas águas em geral, ocorre por assimilação do fósforo pelas algas para seu metabolismo e por

TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTE SECUNDÁRIO, USANDO A MICROALGA *Chlorella sp.* IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE CÁLCIO.

precipitação de fosfatos em condições de pH elevado. A absorção de fósforo pelas microalgas pode ocorrer na forma de polifosfato solúvel, usado para a síntese de alguns constituintes celulares, tais como, fosfolipídios, nucleotídeos e ácidos nucléicos. No sistema de algas imobilizadas, a retirada de fósforo do sistema ocorre pela substituição das esferas no bioreator, neste trabalho foram usadas as mesmas esferas em três experimentos em triplicata num período de 21 dias. Lukavski et al. (1986) relataram que os nutrientes tais como amônia e fosfato poderiam primeiro ser adsorvidos sobre a superfície da matriz, em seguida penetrar lentamente na esfera e ser assimilado pela célula. Isso explica a significativa remoção química realizada pelas esferas de alginato nos bioreatores controle na primeira hora de contato, onde foi observada remoção média de 50% para fósforo total e 62% para ortofosfato. Os resultados de remoção média de fósforo total estão representados na Figura 19 e de remoção média de ortofosfato na Figura 20.

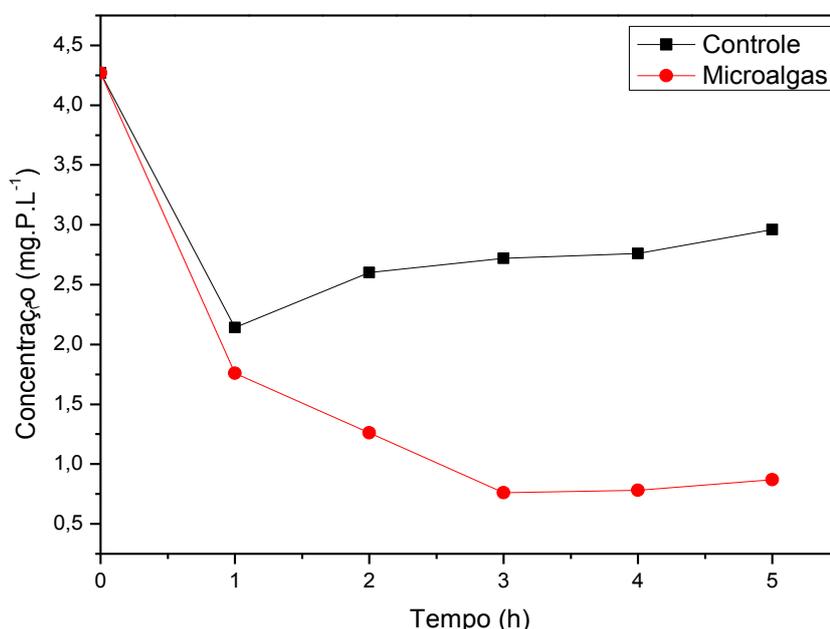


FIGURA 19: Remoção média de 9 determinações de fósforo total durante a batelada.

TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTE SECUNDÁRIO, USANDO A MICROALGA *Chlorella sp.* IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE CÁLCIO.

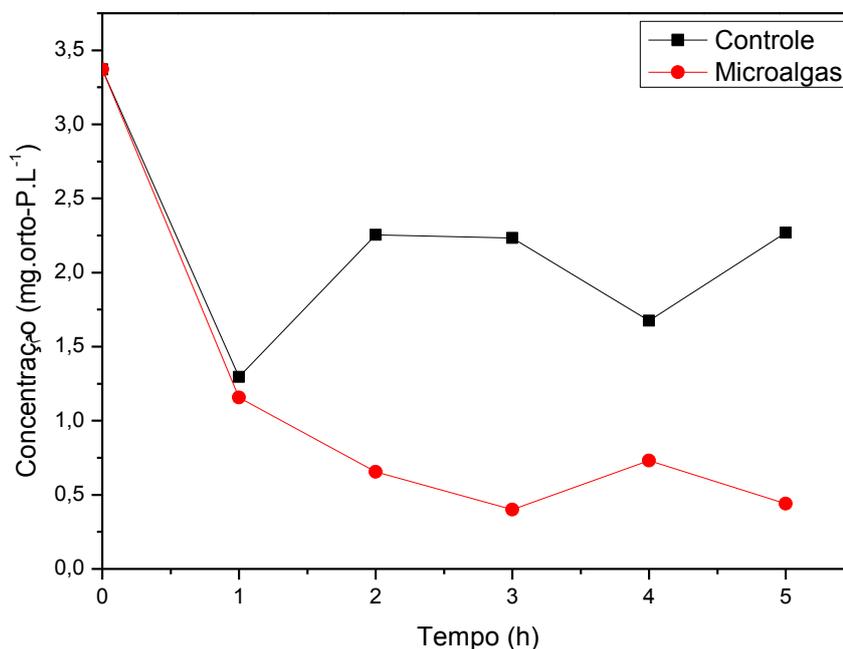


FIGURA 20: Remoção média de 9 determinações de ortofosfato durante a batelada.

De acordo com a interpretação dos dados observados nestes experimentos, as algas imobilizadas realizaram ao final de um perfil de 5 h, eficiência média de remoção em torno de 87% para ortofosfato e 79,63% para fósforo total e obtiveram maior eficiência na remoção de fósforo em relação ao controle em todos os tempos de contato, atingindo seus maiores percentuais na 4^a hora de contato para fósforo total (71,43%) de acordo com a Figura 19, na 3^a hora para ortofosfato (82,61%), conforme Figura 20. A remoção química, realizada pelas esferas controle durante o ensaio, foi aproximadamente 31% para as duas formas de fósforo. Os resultados obtidos nestes ensaios, podem ser relacionados aos dois mecanismos de remoção anteriormente citados, nesse aspecto, devendo ser observada a relevância do processo fotossintético realizado pelas algas, elevando o pH do meio, favorecendo a remoção de fósforo. Nas Figuras 21 e 22 está apresentada respectivamente a remoção de fósforo total e ortofosfato solúvel em relação à elevação do pH no sistema.

TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTE SECUNDÁRIO, USANDO A MICROALGA *Chlorella sp.* IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE CÁLCIO.

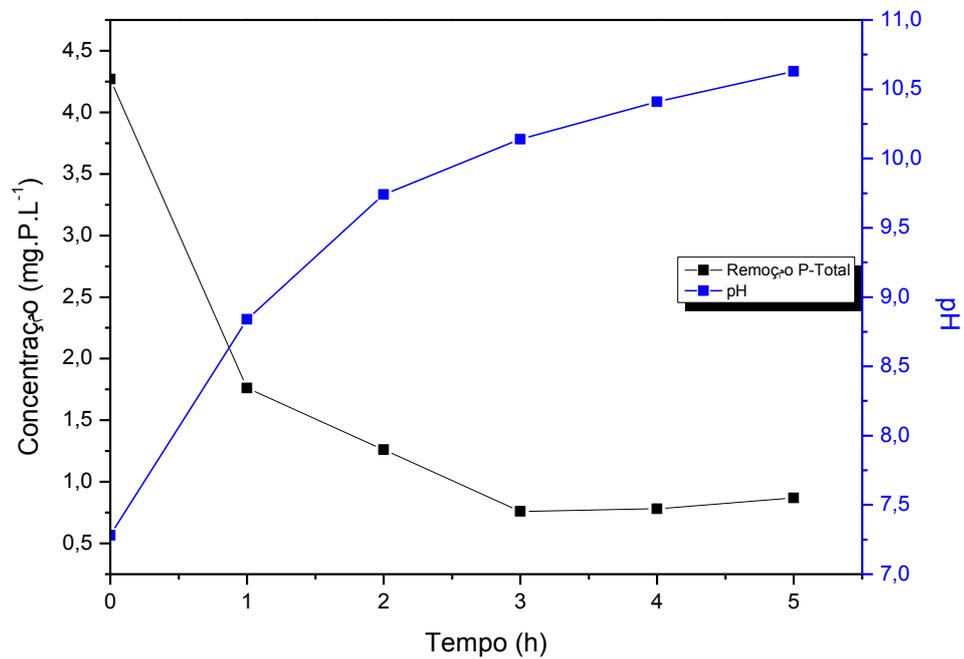


FIGURA 21: Remoção média de 9 determinações de fósforo total durante a batelada em comparação com a elevação do pH no sistema.

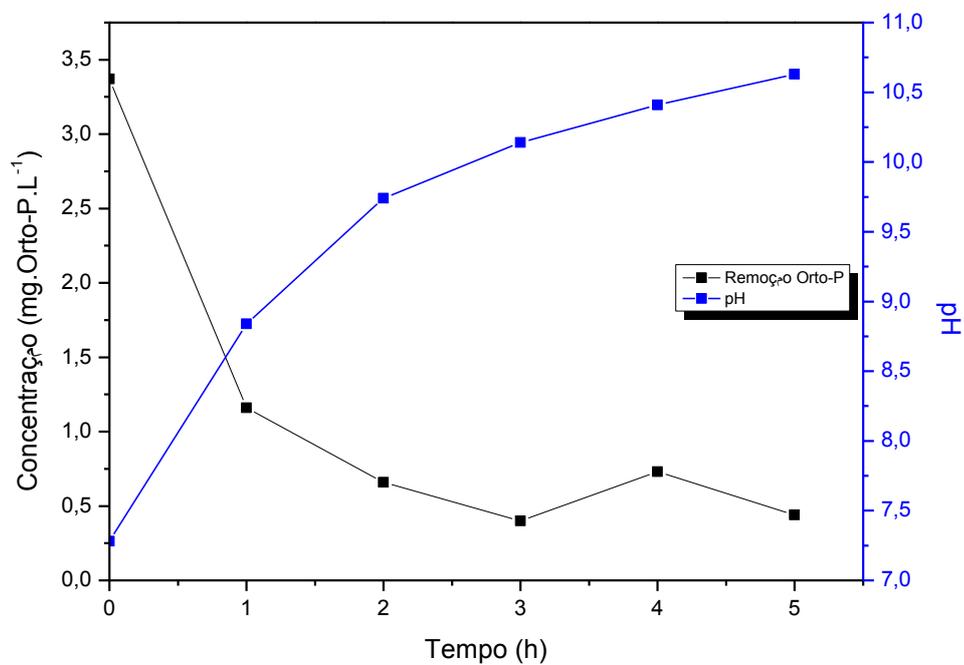


FIGURA 22: Remoção média de 9 determinações de ortofosfato solúvel durante a batelada em comparação com a elevação do pH no sistema.

5.2.2.3. Decaimento de coliformes termotolerantes

Os resultados foram analisados através de amostras de quatro experimentos laboratoriais sob luz artificial. Os valores das reduções de todos os experimentos foram expressos em escala logarítmica em relação à redução dos controles. Foi observada na Tabela 5, redução significativa na concentração de coliformes termotolerantes em bioreator de *Chlorella sp.*, em relação ao controle, para os tempos de contato de 2 horas (99%) e 6 horas (99,9999%). Houve uma remoção média de 99% (2 logs) a cada 2 horas de contato do efluente contaminado com as esferas de algas imobilizadas. Na Tabela 4 estão apresentados os valores médios obtidos em três experimentos realizados em ambiente com temperatura controlada (27°C).

TABELA 5: Valores médios de remoção de coliformes termotolerantes (bioreatores de 0,1L)

Coliformes termotolerantes				
Tempo(h)	Reator com algas		Reator sem algas	
	UFC*/100 mL	pH	UFC*/100 mL	pH
0	1,42 x 10 ⁶	7,28	1,42 x 10 ⁶	7,28
1	2,18 x 10 ⁵	8,84	1,38 x 10 ⁶	7,38
2	1,17 x 10 ⁴	9,74	1,45 x 10 ⁶	7,47
3	0,4 x 10 ⁴	10,14	1,40 x 10 ⁶	7,53
4	2 x 10 ³	10,41	1,32 x 10 ⁶	7,62
5	0,5 x 10 ²	10,63	1,34 x 10 ⁶	7,77
6	0	10,99	1,25x 10 ⁶	7,79

* Unidades Formadoras de Colônias

Pearson et al. (1987a) analisando em laboratório os efeitos da temperatura sobre o decaimento de coliformes termotolerantes a pH=9, concluíram que aumenta o decaimento com o aumento da temperatura dos mesmos. Porém, em outros experimentos laboratoriais com pH=7,6 decaimentos significativos ocorrem apenas com temperaturas de 35⁰ C. Os

TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTE SECUNDÁRIO, USANDO A MICROALGA *Chlorella sp.* IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE CÁLCIO.

autores indicam que os valores de $\text{pH} > 9$ representam papel fundamental na eficiência do decaimento de coliformes termotolerantes. Os decaimentos observados nestes experimentos indicam que, sob as condições de operação descritas, os sistemas com microalgas são eficazes na redução da concentração de coliformes termotolerantes. A elevação do pH desempenhou papel fundamental na eficiência bactericida do sistema. Conforme Tabela 5, os dados indicam que em pH em torno de 11, e em temperatura controlada de 27°C , a atividade celular das microalgas e a irradiação de fótons sob os efluentes atuaram em conjunto para promover o decaimento bacteriano. Na Tabela 6 estão representados os valores médios de co-remoção (de fósforo e coliformes termotolerantes) com o respectivo perfil do pH em bioreatores de 0,1L alimentados pelo efluente do tanque séptico em regime de batelada intermitente.

TABELA 6: Valores médios de co-remoção de fósforo e coliformes termotolerantes

Tempo de Contato (h)	Concentração mg.P/L	Concentração mg P- PO_4^{3-} /L	Coliformes termotolerantes	pH
0	4,27	3,37	1420000	7,25
1	1,76	1,16	218000	9,07
2	1,26	0,66	11700	9,77
3	0,76	0,4	4000	9,98
4	0,78	0,73	2000	10,26
5	0,87	0,44	500	10,62
6	-	-	0	10,97
Eficiência	79,72%	86,98%	99,9999%	-

5.2.3. ETAPA I-B (Bioreatores de 0,1L alimentados com efluente do filtro de areia)

Os resultados de remoção de fósforo total obtidos nos bioreatores controle e com diferentes concentrações de alginato, mostraram-se

TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTE SECUNDÁRIO, USANDO A MICROALGA *Chlorella sp.* IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE CÁLCIO.

significativos em concentrações de fósforo afluente de 5,33 mg.P/L. A análise da Figura 23, permite perceber que os valores médios de remoção química em 3 horas de contato para os reatores controle, foram em torno de 51%, provavelmente o mecanismo de remoção foi por adsorção na matriz imobilizante, ou mesmo por precipitação de fosfato de cálcio na matriz de alginato. Segundo (JIMENEZ-PEREZ et al., 2004) em sistema de algas imobilizadas, o fosfato pode ser também removido por precipitação química como fosfato de cálcio dentro da matriz de alginato, devido a presença de íons de cálcio na mesma. Os bioreatores com microalgas imobilizadas em concentrações de alginato de cálcio de 2% e 4% obtiveram maior eficiência, removendo respectivamente 82,8% e 85,7%. Conforme exposto na Figura 23, o reator com microalgas imobilizadas a 6% de alginato apresentou menor desempenho, com eficiência de 39,24% em 3 horas de contato. Este resultado pode estar relacionado com a maior quantidade de polímero na esfera, dificultando a penetração da luz, e, portanto, comprometendo o processo fotossintético.

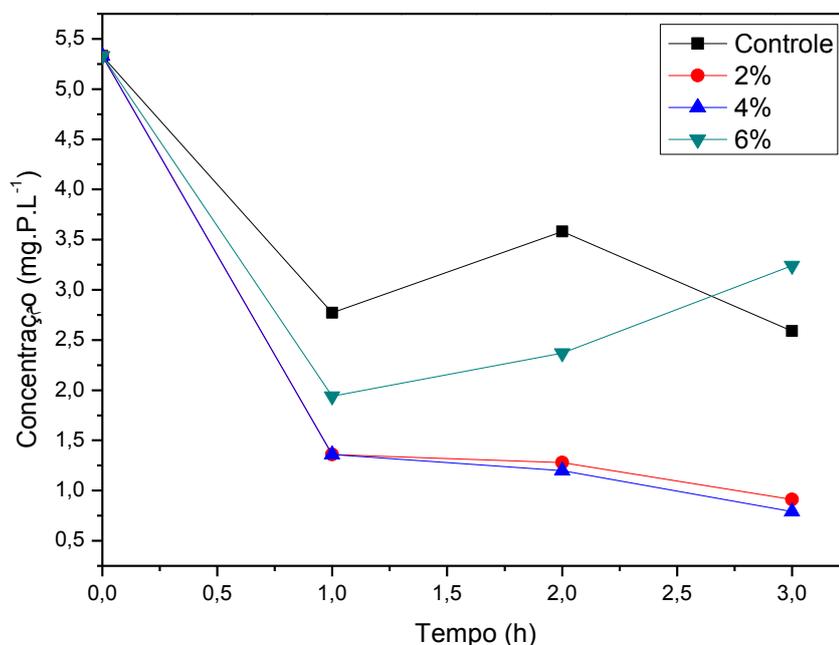


FIGURA 23: Remoção média de fósforo total em bioreatores de 0,1 L

5.2.4. ETAPA II (Bioreatores de 1L com algas imobilizadas e controle, alimentados com efluente do filtro de areia)

Os resultados de remoção de fósforo obtidos no reator com microalgas imobilizadas foram sempre decrescentes ao longo dos tempos de contato. Os percentuais de remoção bioativa (reator com microalgas imobilizadas) foram em torno de 81%, enquanto que no bioreator controle (esferas de alginato), esse valor não ultrapassou 13% em 5 horas de contato. A remoção química realizada pelo bioreator controle registrada nesse trabalho foi observada por outros autores. Segundo Abdel Hammed (2007), o principal mecanismo de remoção de fósforo nos sistemas de algas imobilizadas se dá por assimilação algal para realização do metabolismo celular e pela adsorção no gel de alginato. Na Figura 24 estão representados os valores de remoção média de 9 determinações de fósforo total entre o bioreatores controle e com *Chlorella sp.* imobilizada em 5 horas de tempo de contato.

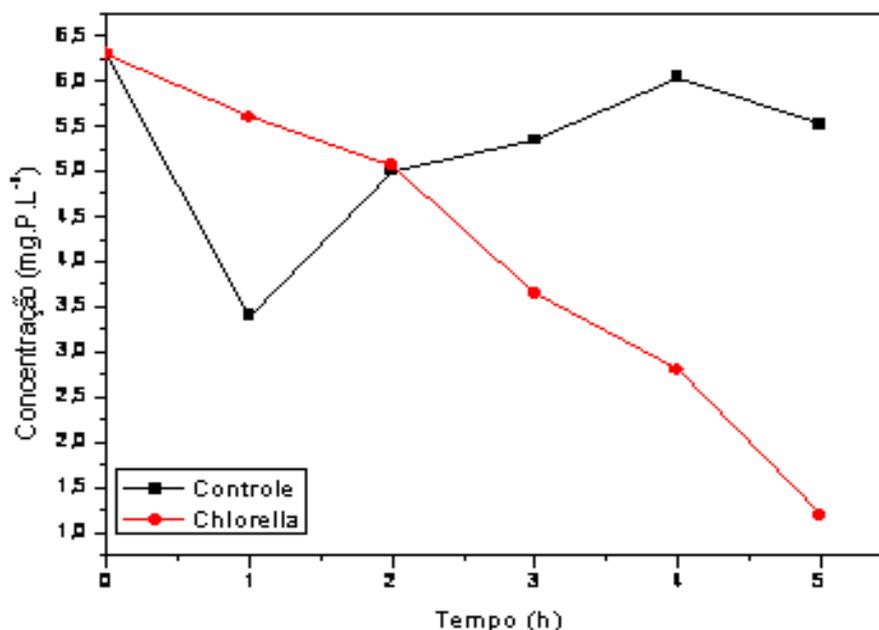


FIGURA 24: Remoção média de fósforo total em bioreatores de 1L- controle e com *Chlorella sp.*

De acordo com a Figura 24, as microalgas imobilizadas apresentaram eficiência progressiva de remoção de fósforo em relação ao tempo de contato anterior e ao bioreator controle. Jimenez-Perez et al. (2004), avaliando a absorção de fósforo em microalgas verdes imobilizadas e microalgas livres, atribuíram essa remoção de fósforo em microalgas imobilizadas, à elevação do pH no sistema, à assimilação realizada pelas algas e também pela precipitação de fósforo dentro da matriz de alginato de cálcio. Pois, embora seja este último, um aspecto a ser investigado pelos pesquisadores, vários autores (DE LA NOUE, 1988, TAM e WONG, 2000, LAU et al., 1997) já concordam com essa possibilidade. Em estudos realizados com o gênero *Chlorella*, (LAU et al., 1997) verificaram que a remoção de fosfato foi de 38% com células de culturas livres de *Chlorella vulgaris* e 94% para células imobilizadas em alginato de cálcio após 24 horas de contato. Este fenômeno pode ser atribuído principalmente aos elevados valores de pH e a liberação de íons cálcio (Ca^{2+}) do polímero de alginato, provocando precipitação química de íons fosfato (TAM e WONG, 2000).

5.2.5. ETAPA III (Bioreatores de 1L com algas imobilizadas em concentrações de 4% e 6% de alginato, alimentados com efluente do filtro de areia)

Conforme as Figuras 25 e 26, o bioreator com algas imobilizadas em alginato a 4%, apresentou eficiência média de remoção em torno de 48,8% para concentração de 5,6 mg.P/L afluente e 72,4% para concentração de 10,7 mg.P/L em 3 horas de tempo de contato. Nas Figuras 27 e 28, são apresentados os resultados do bioreator com algas imobilizadas em alginato a 6%, sendo observado que houve remoção média em torno de 49% para concentração de 5,33 mg.P/L e 63% para concentração de 10,82 mg.P/L. Esses percentuais pouco expressivos, podem estar relacionados com o elevado número de esferas utilizado em cada ensaio, visto que, por vezes, as esferas, principalmente as que se situam na parte inferior do bioreator compactaram sob a pressão das esferas situadas na parte superior, outro

TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTE SECUNDÁRIO, USANDO A MICROALGA *Chlorella sp.* IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE CÁLCIO.

aspecto que destacamos, foi a forma de alimentação que nesses ensaios, foi realizada pela parte superior do bioreator. Esse procedimento deve ter dificultado o contato do efluente com a célula, comprometendo o tratamento eficiente do efluente. Vale salientar que nessas condições, provavelmente, apenas as esferas que estão em contato direto com a parede do bioreator podem realizar fotossíntese, não sendo o suficiente para promover significativas elevações no pH.

Os resultados de remoção de fósforo obtidos nessa etapa experimental sugerem que não existem diferenças expressivas utilizando-se matriz de alginato em concentrações de 4% e 6%, todavia, a concentração elevada de alginato nas esferas com alginato a 6%, pode ter dificultado a penetração da luz e a passagem do efluente. Os dados de remoção para as diferentes concentrações de fósforo afluentes são ilustrados nas Figuras 25, 26, 27 e 28.

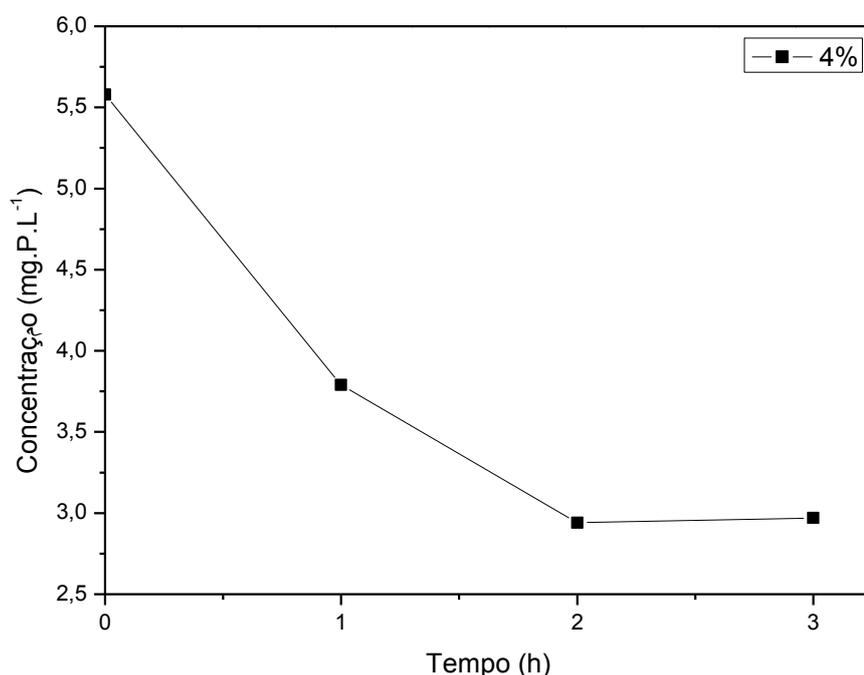


FIGURA 25: Remoção média de fósforo total no bioreator 4% em concentração de 5,33 mg.P/L

TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTE SECUNDÁRIO, USANDO A MICROALGA *Chlorella sp.* IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE CÁLCIO.

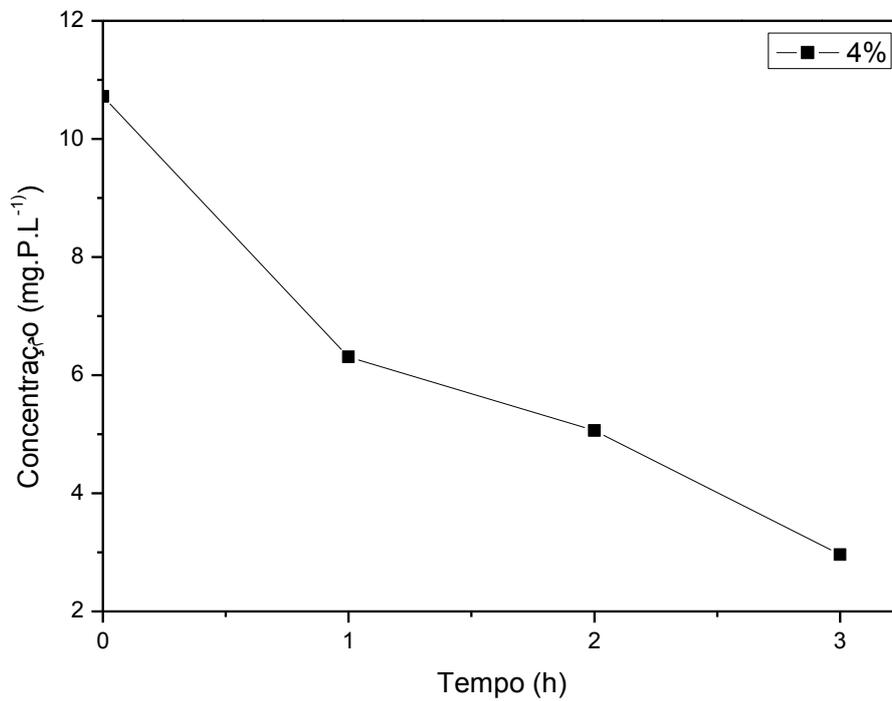


FIGURA 26: Remoção média de fósforo total no bioreator 4% em concentração de 10,82 mg.P/L

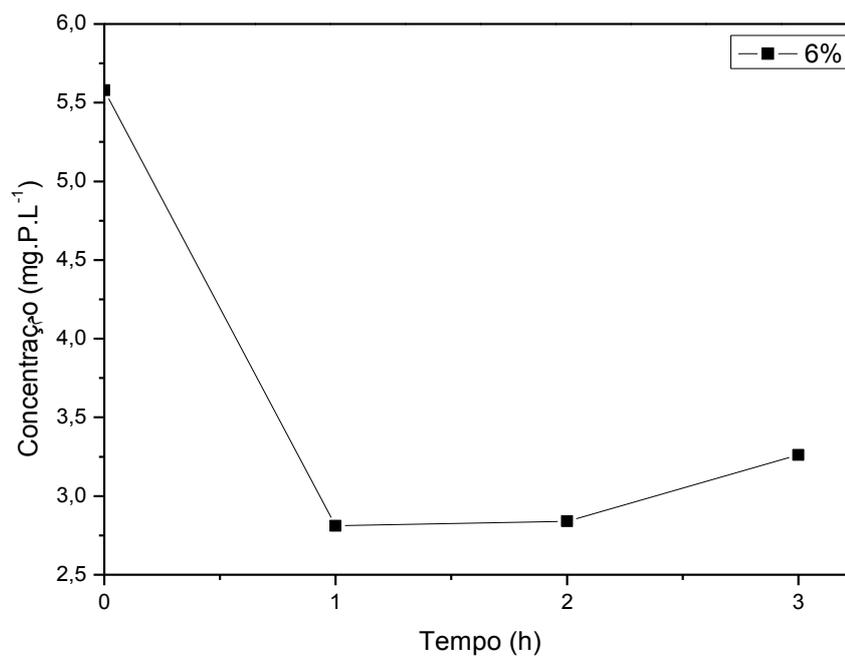


FIGURA 27: Remoção média de fósforo total no bioreator 6% em concentração de 5,33 mg.P/L

TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTE SECUNDÁRIO, USANDO A MICROALGA *Chlorella sp.* IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE CÁLCIO.

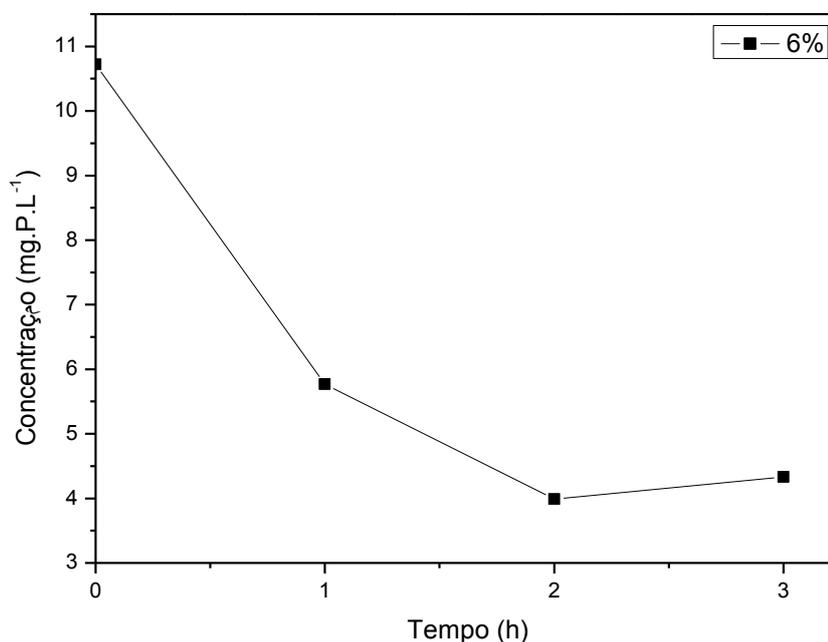


FIGURA 28: Remoção média de fósforo total no bioreator 6% em concentração de 10,82 mg.P/L

As remoções de fósforo na 1ª hora em reatores com algas imobilizadas alimentados com concentrações afluentes de 5,33 mg P/L e 10,82 mg P/L foram de, respectivamente, 32 e 42%, para a concentração de alginato de 4% ,e de, respectivamente, 50 e 46%, para a concentração de alginato de 6%. Este resultados associados aos valores de pH apresentados na Figura 29 obtidos ao longo dos experimentos, são indicadores de que o mecanismo de remoção nesses ensaios pode ter sido de natureza química, pois a grande quantidade de esferas, a forma de alimentação pela parte superior do bioreator e a elevada concentração de alginato por esfera podem ter interferido no contato da alga com o efluente, dificultando o metabolismo algal.

5.2.5.1. pH

Valores médios de pH obtidos da leitura de cada amostra coletada nos experimentos em batelada intermitente com bioreatores de 1,0L, revelaram que o incremento que ocorreu ao longo de 3 horas foi de 0,7, partindo-se de 5,3 e chegando a 6,0 unidades de pH na 3ª hora de contato. Esse resultado é um

TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTE SECUNDÁRIO, USANDO A MICROALGA *Chlorella sp.* IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE CÁLCIO.

indicador de que a remoção nessas condições, provavelmente não se processou pela via biológica, e sim, pela via química. Os valores médios de pH nos bioreatores com alginato de cálcio à 4% em três horas de contato, estão apresentados na Figura 29.

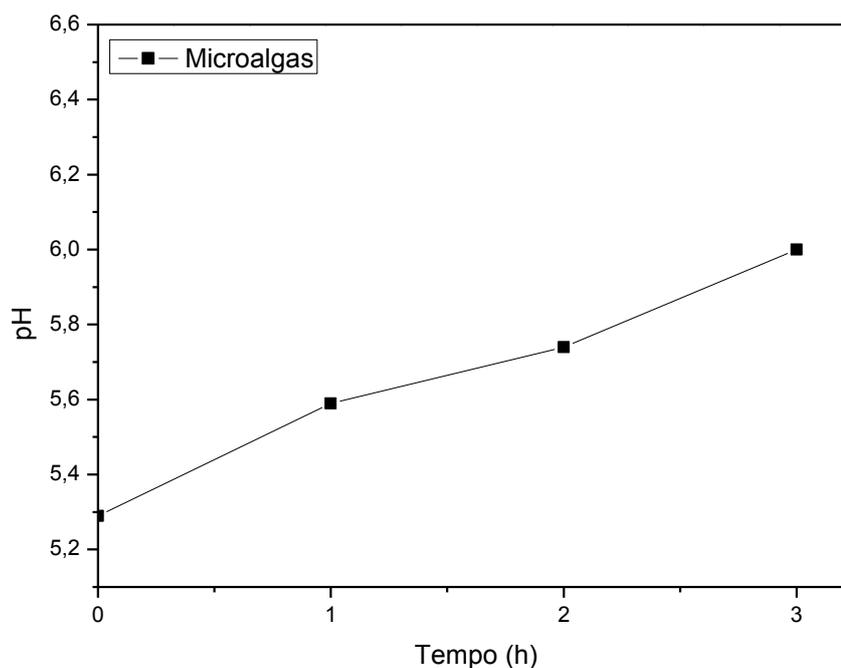


FIGURA 29: Valores médios de pH em bioreatores a 4%

Na Figura 29 pode ser verificado que o pH no bioreator com microalgas iniciou com o valor médio de 5,3 atingindo 6,0 em três horas de contato, recebendo um incremento de apenas 0,7. Esses resultados podem ser explicados pela dificuldade de contato do efluente com a superfície da esfera, dada à compactação registrada principalmente nas esferas situadas na parte inferior. Eles são indicativos de inibição do metabolismo algal no sistema. Além da quantidade de esferas já citada, outra hipótese parece explicar esses resultados, a elevada concentração do alginato pode ter formado sombreamento, dificultando a passagem da luminosidade, comprometendo o processo fotossintético. Robinson et al. (1986) e Lau et al. (1997) trabalhando com esferas de 4 mm de diâmetro, observaram que a concentração elevada de esferas de algas causa redução na penetração da luz e maior auto sombreamento para as esferas situadas na parte inferior do reator.

6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Tomando-se por base a análise dos dados deste trabalho, pode-se concluir que:

- ▶ Em bioreatores com tubulares, operados em regime de batelada intermitente, alimentados com efluente do tanque séptico, a *Chlorella sp.* imobilizada, apresentou eficiência de co-remoção, fósforo total de 80% e decaimento de coliformes termotolerantes de 99,9999%;

- ▶ Os melhores resultados de remoções de fósforo total obtidos com bioreatores de 0,1L, foram com algas imobilizadas em concentrações de alginato de cálcio à 2% e 4%. As algas imobilizadas em esferas com concentração de 2% apresentaram remoções satisfatórias com os dois afluentes usadas na alimentação, com remoção de 80% (efluente de tanque séptico) e 83% (efluente de filtro de areia intermitente);

- ▶ Em bioreatores com capacidade de 1L, com algas imobilizadas em concentrações de alginato de 2%, 4% e 6%, alimentados em batelada, pelo efluente do filtro de areia, a remoção atingiu valores de 81% no bioreator com microalgas em esferas de alginato à 2%. Os valores de remoção para os bioreatores com 4% e 6% de alginato foram significativamente menores;

- ▶ Os resultados dessa pesquisa apontam para o potencial de co-remoção de fósforo e coliformes termotolerantes das microalgas em bioreatores tubulares em escala laboratorial, com luz contínua, temperatura de 27^oC e tempo de retenção ótimo de 3 horas para remoção de fósforo e 6 horas para remoção total de coliformes termotolerantes em regime de batelada intermitente. As condições operacionais, ainda estão em investigação.

TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTE SECUNDÁRIO, USANDO A MICROALGA *Chlorella sp.* IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE CÁLCIO.

Diante do trabalho desenvolvido, considera-se que ainda existem aspectos técnicos dentro da biotecnologia das algas imobilizadas que merecem ser investigados, portanto recomendam-se:

- ▶ A Investigação de novas configurações geométricas para os bioreatores, favorecendo aos processos metabólicos (notadamente a fotossíntese) que é fundamental nos sistemas de algas imobilizadas;
- ▶ A avaliação desses bioreatores com a *Chlorella sp.* e outras espécies de microalgas imobilizadas, em escala-piloto em regime de fluxo contínuo;
- ▶ Desenvolvimento de novas pesquisas que visem a melhoria na qualidade dos polímeros, de forma a aumentar sua resistência ao rompimento, bem como, a difusão das substâncias e passagem da luminosidade até a célula;
- ▶ O desenvolvimento de técnicas de imobilização que interfiram minimamente na fisiologia das células.

7. REFERÊNCIAS

ABDEL HAMEED, MS.. **Armazenagem em longo prazo de *Chlorella vulgaris* imobilizada.** Assuit Universidade J.: Bot., 245-52. 2007.

AGUILAR-MAY, B.; SÁNCHEZ-SAAVEDRA, M. P.; LIZARDI, J.; VOLTOLINA, D.; **Growth of *Synechococcus sp.* immobilized in chitosan with different times of contact with NaOH.** J. Appl. Phycol. 19, 181–183. 2007.

APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 18th Edition. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington, DC. 1998.

ANISHA, G.S.; PREMA, P. **Cell immobilization technique for the enhanced production of galactosidase by *Streptomyces griseoloalbus*.** Bioresource Technology, v. 99, n. 9, 2008. p. 3325-3330.

BAUDISOVA, D. **Evolution of *Escherichia coli* as the main indicator of faecal pollution.** Water Science and Technology, v. 35, n.11-12, 1997. p. 333-336.

BICUDO, C.E.M.; MENEZES, M. **Gêneros de Algas de Águas Continentais do Brasil:** Chave para identificação e descrições. Rima. 2006. 508p.

BISCHOFF, H. W.; BOLD, H. C. **Physiologic studies. IV. Some algae from Enchanted Rock and related algae species.** University of Texas Publications, v. 6318, 1963. p.1- 5.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. **Biotechnologia Industrial:** Fundamentos. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 1, p. 5-8.

BOROWITZKA, M. A. **Micro-algal Biotechnology Cambridge.** University Press. Cambridge. 1988.

BORAAS, ME, SEALE DB, BOXHOM, JE (1998) – **Phagotrophy by a flagellate selects for colonial prey: A possible origin of multicellularity**, Evolutionary Ecology, 12, 153-164.

BRANDENBERGER, H.; WEDMER, F. **A new multinozzle encapsulation/immobilization system to produce uniform beads of alginate.** *Biotechnol.*, 1998. p. 63-80.

BRUNENTON, J. **Pharmacognosie, phytochimie, plantes medicinales.** 2 ed. Paris: colonial prey: A possible origin of multicellularity, *Evolutionary Ecology*, 12, 153-164. 1993.

CHEVALIER P.; e DE LA NOUE J.; **Wastewater nutrient removal with microalgae e immobilized in carragenan.** *Enzyme micro techonol.*, v. 7, 1985a. p. 621-624.

CLEMENTI, F; FANTOZZI,P; MANCINI,F; MORESI,M; **Enzyme Mycrobilogic Tecnologic** , 1997,17, 983.

COHEN, Y., 2001. **Biofiltration – the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review.** *Bioresour. Technol.* 77, 257–274.

DAY, J. G.; G. A. CODD. **Photosynthesis and glycollate excretion by immobilized *Chlorella emersonii*** . *Biotechnol. Let* 1985, 7: 573.

DAVIS-COLLEY,R.J.; DONNISON,A.M.; SPEED, D. J. 1997. **Sunlight wavelengths in faecal indicator microorganisms in waste stabilization ponds.** *Water Science and Technology*, v. 35, n. 11-12, 219-225 p.

DE- BASHAN, L. E.; MORENO, M.; HERNANDEZ, J. P.; BASHAN, Y. **Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the micro-algae *Chlorella vulgaris* co-immobilized in alginate beads with the micro-algae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasiliense*.** *Water Resouch.*, v. 36, 2002. p. 2941-2948.

DIXO, N. G. H.; GAMBRILL, M. P.; CATUNDA, P. F. C.; van HAANDEL, A. C. **Removal of pathogenic organism from the effluent of an upflow.** *Water Science and Technology*, v. 31, n. 12, 1995. p. 275-284.

EDBERG, S. C.; RICE, E. W.; KARLIN, R. J.; ALLEN, M. J. ***Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection.** J. Applied Microbiology. v. 88, p.106-116, 2000.

FAAFENG, B. A. VAN DONK, E.; KÄLLQVIST, S. T. ***In situ* measurement of algal growth potential in aquatic ecosystems by immobilized algae.** J. Appl. Phycol. 6, 301–308. 1994

FABER, K. **Special Techniques: Immobilization.** In: _____. **Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook.** 2 ed. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p. 312-322.

FORREST, J. M. **The use of immobilized algae for removal of bacterial pathogens from wastewater.** Honours Project. University of Liverpool. 1998.

GARCÍA-GONZÁLEZ, M. et al. **P of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis- β -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor.** Journal of Biotechnology, 2005. 115: 81-90.

GUO, X-L.; DENG, G.; XU, J.; WANG, M-X. **Immobilization of *Rhodococcus sp.* AJ270 in alginate capsules and its application in enantio selective biotransformation of trans-2-methyl-3-phenyl-oxiranecarbonitrile and amide.** Enzyme and Microbial Technology, v. 39, n. 1, p. 1-5, 2006.

HIRAYAMA, S.; UEDA, R.; SUGATA, K. **Evaluation of active oxygen effect on photosynthesis of *Chlorella vulgaris*.** Free Radical Research, v.25, n.3, p.247-257, 1996.

HSIUAN-LIN, W.; RUEY-SHYANG, H.; LIANG-PING, L.; **Identification of *Chlorella spp.* Isolates using ribosomal DNA sequences,** Bot. Bull. Acad. Sin., 2001, 42:115-121.

HILLER, U. W.; PARK, R. B.; **Photosynthetic light reactions in chemical fixed *Anacystis nidulans*, *Chlorella pyrenoidosa* and *Phormidium cruentum*.** Physiol Plant, 1966 44:535-539 .

JIMENEZ-PEREZ, M. V.; SANCHEZ-CASTILLO, P.; ROMERA, O.; FERNANDEZ-MORENO, D.; PEREZ-MARTINEZ, C.; **Crescimento e**

remoção de nutrientes em livre e immobilizada planktonic green algae isolated from pig manure. *Enzima Microb. Technol.* 34, 392–398. 2004.

KAYA, V. M; PICARD, G. **The viability of *Scenedesmus bicellularis* cells immobilized on alginate screens following nutrients starvation in air at 100% relative humidity.** *Biotechnology Bioeng.* 46:459-494. 1995.

LA NOUE, J.; PAUW, N. **The potencial of microalgae Biotechnology: a review of production and uses of microalgae.** *Biotechnol.* v. 6, 1998. p. 725-770.

LALIBERTÉ, G.; PROULX, D.; DE PAUW, N.; DE LA NOÛE, J. 1994. **Algal technology in wastewater treatment.** In: *Algae and Water Pollution*, Rai, L.C., J.P. Gaur, C.J. Soeder (Eds.), Berlin, *Archiv für Hydrobiology*, v. 42, 283-302 p.

LAU, P. S.; TAM, N. F. Y.; WONG, Y. S. **Wastewater nutrients (N and P) removal by carrageenan and alginate immobilized *Chlorella vulgaris*.** *Environmental Technology*, v. 18, 945-951. 1997.

LAU, P. S.; TAM, N. F. Y.; WONG, Y. S.; **Operational optimization of batchwise nutrient removal from wastewater by carrageenan immobilized *Chlorella vulgaris*.** *Water Science and Technology*, 38(1), 185-192. 1998a

LAU, P. S. TAM; N. F. Y.; WONG, Y. S.; **Effect of Carragenan immobilization on the physiological activities of *Chlorella vulgaris*.** *Bioresource Biotechnology*, 63:115-121. Elsevier. 1998b.

LUKAVSKY, J., KOMAREK, J., LUKAVSKÁ, A., LUDVIK J. POKORNY, J., 1986. **A atividade metabólica e a estrutura de células de algas imobilizadas (*Chlorella, Scenedesmus*).** *Arch. Hydrobiology. Suppl.* 73, 261-279.

LECLERC, H.; MOSSEL, D. A. A.; EDBERG, S. C.; STRUIJK, C. B. **Advances in the bacteriology of coliform group: their suitability as markers of microbial water safety.** *Annu. Microbiol.*, v. 55, 2001. p.134-201.

LINS, A. C. ; ROCHA-LEÃO ,M.H.M)- **Removal of Skim Milk Lactose by Fermentation Using Free and Immobilized *Kluyveromyces marxianus* Cells**, World Journal of Microbiology & Biotechnology, v.18, . 2002. p. 187-192.

MALLICK, N., RAI, LC, 1993. **Influence of culture density, pH, organic acids and divalent cations on the removal of nutrients and metals by immobilized *Anabaena doliolum* and *Chlorella vulgaris*** . World J. Microb. Biotechnol. 9, 196– 201.

MARCON, A. E. **Remoção de coliformes fecais com microalgas (*Chlorella*) imobilizadas em matriz de alginato de cálcio**. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia Civil. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Sanitária. Natal, RN, 2005. 63p.

MEGHARAJ, M.; PEARSON, H. W.; VENKATESWARLU, K. **Removal of nitrogen and phosphorus by immobilized cells of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus bijugatus* isolated from soil**. Enzyme, Microbiology and Technology, v. 14, 1992. p.656-658.

MERCHANT, R. E., ANDRE C. A., SICA D. A. **Nutritional supplementation with *Chlorella pyrenoidosa* for mild to moderate hypertension**. Journal of medicinal food, v.5, n 3, p.141-152, 2002.

MUNOZ, R. and Guieysse, B. (2006) **Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review**. Water Research, 40 (15), 2799-2815.

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

MYERS, J. 1980. **On the algae: thoughts about physiology and measurements of efficiency**. In Primary Productivity in the Sea, ed. P. G. Falkowski, New York: Plenum Press, 1-16 p.

NOWACK, E. C. M.; B. PODOLA; MELKONIAN, M. **The 96-well twin-layer system; A novel approach in the cultivation of microalgae**. Protist, 156 239-51. 2005.

OGBONNA, J. C.; MASHIMA, H.; TANAKA, H. Scale up of fuel ethanol production from sugar beet juice using loofa sponge immobilized bioreactor. **Bioresource Technology**, Essex, v. 76, n. 1, p. 1-8, 2000.

PAGE, M. F. 2000. **Immobilized algal systems for the removal of bacteria and viruses in wastewater treatment technology**. Honours project. University of Liverpool.

PANIANGUA, L. M. **El Tecnitatl, Concentrado de algas *Spirulina* frente de proteínas comestibles Del pueblo de los Aztecas** . México,2003.p.1-8.

PRADELLA, J. G. C.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Reatores com células imobilizadas. In: Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 4 v. v 2, cap. 16, p. 355-372.

PEARSON, H. W. **Estimation of chlorophyll-a as a measure of algae biomass in waste stabilization ponds. In Proceedings of the regional Seminar on the Waste Stabilization Pond Research**, 3-7 March. Pan American Center for Sanitary Engineering and Environment Sciences, Lima. 1986.

PEARSON, H. W.; MARA, D. D.; BARTONE, C.R. 1987 (a). **Guidelines for the minimum evaluation of the performance of full-scale waste stabilization ponds systems**. Water Research, vol. 21, n. 9, 1067-1075 p.

RANGEBY, M.; JOHANSSON, P.; PERNUP, M. 1996. **Removal of fecal coliforms in a wastewater stabilization pond**. Water Science and Technology, vol. 34, n. 11, 149-157p.

RAI, L. C.; GAUR, J. P.; E SOEDER, C. J.; (hidrobiologia peles Archiv, v. 42). Berlim, pp 283-302. 1993.

ROY, I.; GUPTA M. N.; **Hydrolysis of starch by a mixture of glucoamylase and pullulanase: entrapped individually in calcium alginate beads**. Enzyme and Microbial Technology 34, 26-32. 2004.

ROBINSON, P. K.; DAINTY, A. L.; GOULDING, K. H.; SIMPKINS, I.; TERVAN, M.D. **Physiology of alginate-immobilized *Chlorella*. Enzyme, Microbiology and Technology.** v. 7, 1985. p. 212-216.

ROBINSON, PK; MAK, AL E TREVAN, MD (1986). **Imobilizado algas: uma revisão.** *Processo Biochem.* 21, 122-127.

ROMO, S. E C. PEREZ-MARTINEZ, 1997. **O uso de imobilização em esferas de alginato de armazenagem em longo prazo de *Pseudanabaena galeata* (Cyanobacteria) em laboratório.** *J. Phycol.*, 33 1073-6

SIAN, R. **Ammonia uptake by *Chlorella vulgaris* immobilized by calcium-alginate beads for the application in the nutrient stripping of treated wastewater.** Honours project. University of Liverpool. 1984.

SILVA, F. da. **Biorremocão de nitrogênio, fósforo e metais pesados(Fe,Mn,Cu,Zn) do efluente hidropônico, através do uso da *Chlorella vulgaris*.** Dissertação (Mestrado)_Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-graduação em Agroecossistemas.Florianópolis, SC, 2006. 70p.

SILVA, S. A. P. **Biorremediação em águas residuais: remoção de fosfatos utilizando microalgas *Chlorella vulgaris* imobilizadas em meio de alginato de cálcio.** 2007. Dissertação (Mestrado). Universidade do Porto, Departamento de Zoologia e antropologia, 2007. 72p.

SOUSA,J.T. de; VAN HAANDELL, A. C.; CAVALCANTI, P.F.F.; FIGUEIREDO A.M.F de. **Tratamento de Esgoto pra Uso na Agricultura do Semi-Árido Nordeste.** *Engenharia Sanitária e Ambiental*, Rio de Janeiro,v.10,n.3, 2005, p260-265.

SUASSUNA, K. **Campanha de Substâncias e Tecnologias Tóxicas.** Greenpeace, São Paulo– Brasil. 2001.

SHINY, K. J.; REMANI, K. N.; NIRMALA. E.; JALAPA, T. K.; SASIDHARAN, V. K. **Biotreatment of wastewater using aquatic invertebrates, *Daphnia magna* and *Paramecium caudatum*.** *Biosource Technology- Elsevier*, v. 96, 2004. p. 55-58.

SMIDSROD, O. E. G. SKJAK-BRAEK. 1990. **Alginato como matriz de imobilização para as células.** Tendências Biotecnológicas: 8. 71-78.

SRIVASTAVA, R. & KULSHRESHTHA, D. K. 1989. **Bioactive polysaccharides from plants.** Phytochemistry, vol. 28, 2877-2883 p. Lavoisier. NY54W3.1993

SINGH, Y., Photosynthetic activity, lipid and hydrocarbon production by alginate-immobilized cells of *Botryococcus* in relation to growth phase. J. **Microbiol. Biotechnology.** 13, 687–691. 2003.

TAM, N. F. Y, WONG, Y. S, **Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal.** Environ. Pollut. 107, 145-151. 2000.

TAMPONNET, C. F.; COSTANTINO, J. N.; BARBOTIN, E. R., CALVAYRAC, **Comportamento citológico e fisiológico de *Euglena gracilis* aprisionada em um gel de alginato de cálcio.** *Physiol. Pl.:*, 63 277-83. 1985.

TAVARES, L. H. S.; ROCHA. O. **Produção de Plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para Alimentação de Organismos Aquáticos.** São Carlos. Rima. 2003 105p.

TIEN, C. J. 2002. **Biosorption of metal ions by freshwater algae with different surface characteristics.** Process Biochemistry, vol. 38, 605-613 p.

TREVAN, M.D. AND A.L. MAK,. **Immobilized algae and their potential for use as bio-catalysts.** Trends Biotechnol., 1988 6: 68–73.

WANG, L.; RIDGWAY, D.; GU, T.; MOO-YOUNG, M. **Bioprocessing strategies to improve heterologous Biotechnology Advances,** New York, v. 23, n. 2, p. 115-129, 2005.

YEAN CHANG, C.. **Imobilizado microalga *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyta, Chlorococcales) para o armazenamento em longo prazo e para aplicação em peixes de controle de qualidade de água da cultura 195.** *Aquicultura*,: 71-80. 2001.

TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTE SECUNDÁRIO, USANDO A
MICROALGA *Chlorella sp.* IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE
CÁLCIO.

XAVIER, J. B.; PICIOREANU, C.; ALMEIDA, J. S.; LOOSDRECHT, M. C. M. V.
Monitorização e modelação *Boletim de Biotecnologia*, São Paulo, v. 76, n.
1, p. 2-13. 2003.

ZHANG, E., WANG, B., WANG, Q., ZHANG, S., ZHAO, B., **Ammonia-
nitrogen and orthophosphate removal by immobilized *Scenedesmus sp.*
isolated from municipal wastewater for potential use in tertiary treatment.**
Bioresour Technology. 99, 3787–3793. 2008.