



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA- UEPB

PRÓ-REITORIA DE PÓS GRADUAÇÃO E PESQUISA

CENTRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

DOUTORADO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

**REMOÇÃO DE NITROGÊNIO E FÓSFORO DE LIXIVIADO DE ATERRO
SANITÁRIO APLICANDO A *Chlorella* sp. IMOBILIZADA EM MATRIZ DE
ALGINATO DE CÁLCIO**

MARIA CÉLIA CAVALCANTE DE PAULA E SILVA

Área de Concentração: Tecnologias de Tratamento de Água e Resíduos

CAMPINA GRANDE – PB

2020

MARIA CÉLIA CAVALCANTE DE PAULA E SILVA

**REMOÇÃO DE NITROGÊNIO E FÓSFORO DE LIXIVIADO DE ATERRO
SANITÁRIO APLICANDO *Chlorella* sp. IMOBILIZADA EM MATRIZ DE
ALGINATO DE CÁLCIO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba-UEPB, em cumprimento às exigências para obtenção do Título de Doutorado.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Valderi Duarte Leite

COORIENTADOR: Prof. Dr. Howard William Pearson

CAMPINA GRANDE – PB

2020

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na 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 do trabalho.

S586r Silva, Maria Célia Cavalcante de Paula e.
Remoção de nitrogênio e fósforo de lixiviado de aterro sanitário aplicando *Chlorella* sp. imobilizada em matriz de alginato de cálcio [manuscrito] / Maria Célia Cavalcante de Paula e Silva. - 2020.
180 p.
Digitado.
Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências e Tecnologia, 2021.
"Orientação : Prof. Dr. Valderi Duarte Leite, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - CCT."
1. Líquido percolado. 2. Remoção de nutrientes. 3. Microalgas. 4. Fitorremediação. I. Título
21. ed. CDD 628.3

MARIA CÉLIA CAVALCANTE DE PAULA E SILVA

**REMOÇÃO DE NITROGÊNIO E FÓSFORO DE LIXIVIADO DE ATERRO
SANITÁRIO APLICANDO *Chlorella* sp. IMOBILIZADA EM MATRIZ DE
ALGINATO DE CÁLCIO.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba-UEPB, em cumprimento às exigências para obtenção do Título de Doutorado.

Aprovada em, 29 de Dezembro de 2020

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Valderi Duarte Leite
Orientador- UEPB



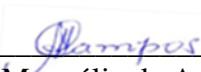
Prof. Dr. Howard William Pearson
Co-orientador- UFCG



Prof. Dr. Roberto Alves de Oliveira
Examinador externo- UNESP



Prof. Dra. Daniele Vital Vich
Examinadora externa /UFAL



Prof. Dra. Magnólia de Araújo Campos
Examinadora externa/ UFCG



Prof. Dra. Neyliane Costa de Souza
Examinadora interna CCT/UEPB

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre estar presente em minha vida, iluminando meus caminhos sendo Norte e Significador de Tudo.

À minha família, meu esposo Rômulo, filha Nicole e filho Alexandre por todo o apoio, zelo e paciência comigo nos muitos momentos solitários que precisei seguir na realização desse trabalho.

À minha irmã Inaldete, que esteve sempre junto me dando seu apoio e colaboração nos dias mais desafiadores.

Agradeço ao meu orientador, professor Valderi Duarte Leite, por ter me acolhido, por ter acreditado em meu potencial produtivo; pela orientação, pela entrega de tantos conhecimentos, por sua valiosa amizade.

Agradeço ao meu co-orientador, professor Howard William Pearson, pelo norte de pesquisa que me deu especialmente nos momentos iniciais da parte experimental desse trabalho, por seu carinho e amizade.

À banca examinadora composta pelo professor Roberto Alves de Oliveira e pelas professoras Daniele Vital Vich, Magnólia de Araújo Campos, Neyliane Costa de Souza e Catarina Simões Andrade do Canto, pela disponibilidade de todo(as) em participar deste trabalho e por todas as contribuições dadas.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental pela oportunidade de me inserir na pesquisa científica efetivamente qualitativa e pelo conhecimento adquirido através de todos os professores com os quais tive aula e recebi orientação.

Aos meus colegas de entrada no PPGCTA- turma 2017, por terem me acolhido e se proposto à grandes aventuras de estudo, construção e aprendizagem em conjunto.

Aos meus colegas, orientandos e orientandas do professor Valderi Duarte Leite, que sempre me estenderam a mão em tantos momentos desafiadores desta pesquisa: coleta, caracterização, análise e escrita.

Aos funcionários, amigas e amigos que a EXTRABES me presenteou. À Virgínia por sempre despertar em mim, o meu melhor enquanto pesquisadora e Amanda, pelas longas conversas de apoio entre amigas e biólogas, parceiras que dividem os desafios e a colheita da pesquisa. À Railson, pela grande ajuda de sempre, esse amigo pesquisador de alma grande e potencial científico privilegiado que o mundo gratamente recebe.

À amiga Catarina Canto por tantas horas de conversas, escutas e orientações de pesquisa e pelo zelo que sempre teve com nossas análises.

À todos que colaboraram, direta ou indiretamente para a concretização desse trabalho, a MINHA GRATIDÃO.

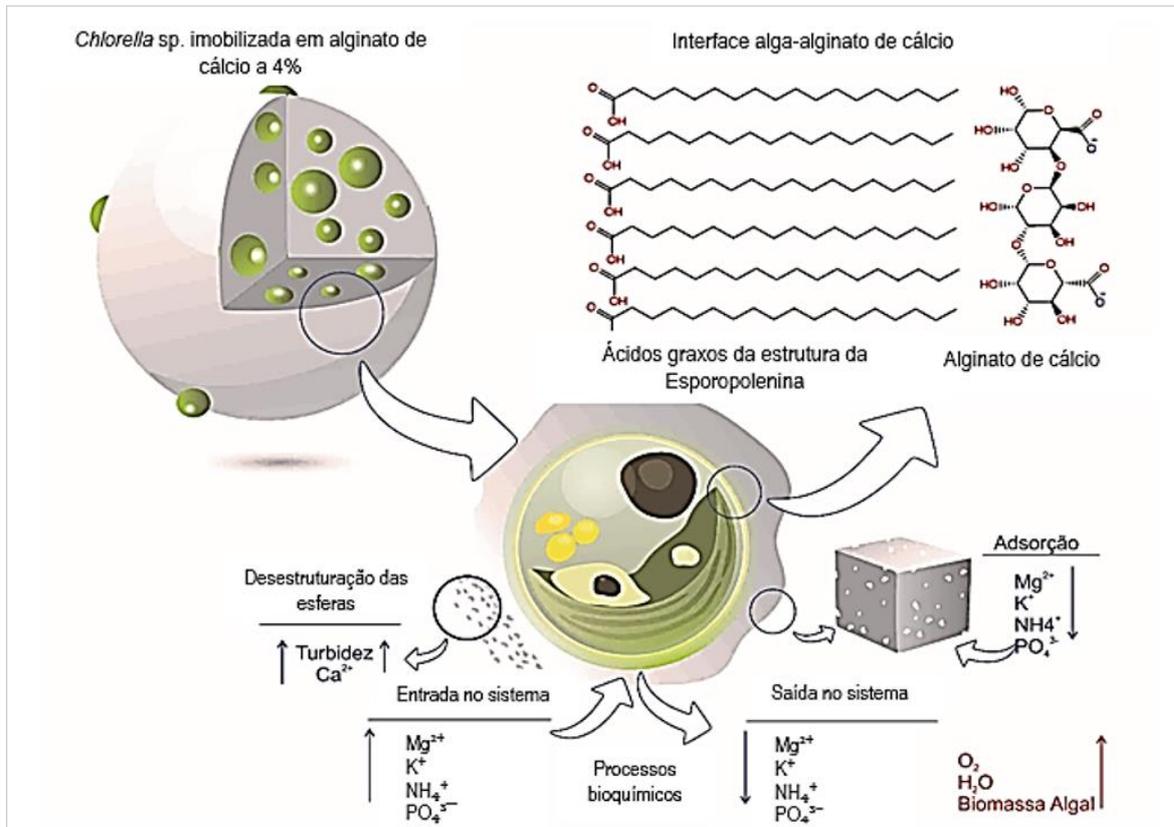
À meus pais Bernadete (Belinha) e Manoel (Nelo) (*in memoriam*),
que de forma singular entregaram para mim,
o seu melhor; a honestidade,
a persistência e o comprometimento
com o serviço a ser realizado.

Ao meu esposo Rômulo Alexandre e amados filhos,
Nicole e Alexandre, pela compreensão
diuturna por minha ausência para
a construção desta pesquisa

Dedico.

Figure Abstract

Mecanismos de interação entre a *Chlorella* sp. immobilizada em alginato de cálcio e os componentes do Lixiviado de aterro sanitário.



Fonte: Autora, (2020)

RESUMO

A geração de resíduos sólidos urbanos representa um desafio que carece da participação de diversos segmentos para a resolução do mesmo. A fração putrescível dos resíduos durante sua biodegradação gera o lixiviado, água residuária de elevado poder contaminante que apresenta matriz complexa com destaque para elevadas magnitudes de sólidos totais, N- amoniacal, fósforo, DQO e substâncias recalcitrantes. Nesse panorama, a tecnologia das algas imobilizadas em alginato, desponta como uma estratégia sustentável e eficiente na remoção de poluentes das águas residuárias. A imobilização consiste na retenção celular em uma região particular do biorreator na qual as reações químicas devem se processar. Esta pesquisa investigou o potencial de fitorremediação por *Chlorella* sp. na remoção de nutrientes do lixiviado de aterro sanitário. O lixiviado foi coletado no Aterro Sanitário Metropolitano de João Pessoa e a cepa de *Chlorella* sp. foi isolada do sistema de lagoas de tratamento de lixiviado e cultivada em Meio Basal de Bold's. Foram monitorados biorreatores tubulares e cônicos alimentados em regimes de batelada e contínuo. Os parâmetros avaliados foram pH, N-amoniacal, P-Total, íons, Chlorofila *a*, Oxigênio dissolvido, íons e turbidez. Foram realizadas as microanálises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS) das esferas com algas imobilizadas. A análise estatística dos dados foi realizada através de um planejamento full fatorial de três níveis Box-Behnken $3^{(2-0)}$ design (BBD) combinada com a metodologia de superfície de resposta e (ANOVA). Nos biorreatores alimentados em batelada e esferas AG/QT(alginato/quitosana) foram obtidas remoções médias de 40% de N- amoniacal com concentrações afluentes médias de 240 mg.L^{-1} . Em esferas com *Chlorella* sp. em AG(alginato) as remoções médias de N-amoniacal foram na faixa de 85,3% na 1ª hora de tempo de contato. Em sistemas suspensos, houve crescimento celular nas faixas de N-amoniacal entre 47 e 2182 mg.L^{-1} , com incremento de Clorofila *a* de 1500% em concentrações de 99 mg.L^{-1} e remoções de até 88 mg-N em concentrações de 798 mg.L^{-1} . Foi verificado que o aumento no percentual de lixiviado inibiu o crescimento celular. No biorreator contínuo com *Chlorella* sp. imobilizada em AG registrou-se remoções de P-total, N-amoniacal, Na^{2+} , K^+ e Mg^{2+} respectivas de 63, 42, 28, 49 e 55% em TDH de 2h. A Fitorremediação foi alcançada através de uma combinação de mecanismos incluindo bioassimilação, precipitação como consequência do pH e adsorção na matriz polimérica. Desta forma, os resultados apontam para o potencial da *Chlorella* sp. no tratamento do lixiviado de aterro sanitário.

Palavras Chave: Líquido percolado; Remoção de nutrientes; Microalgas; Fitorremediação; Matriz polimérica.

ABSTRACT

The generation of solid urban waste represents a challenge that requires the participation of several segments to solve it. The putrescible fraction of the residues during its biodegradation generates the leachate, wastewater of high contaminating power that presents a complex matrix with emphasis on high magnitudes of total solids, N-ammonia, phosphorus, COD and recalcitrant substances. In this context, alginate immobilized alginate technology emerges as a sustainable and efficient strategy for removing pollutants from wastewater. Immobilization consists of cell retention in a particular region of the bioreactor in which chemical reactions must take place. This research investigated the phytoremediation potential of *Chlorella* sp. removing nutrients from landfill leachate. The leachate was collected at the João Pessoa Metropolitan Landfill and the *Chlorella* sp. was isolated from the leachate treatment pond system and grown in Bold's Basal Medium. Tubular and conical bioreactors fed in batch and continuous regimes were monitored. The parameters evaluated were pH, N-ammoniacal, P-Total, ions, Chlorophyll *a*, dissolved oxygen, ions and turbidity. SEM and EDS microanalysis of the spheres with immobilized algae were performed. The statistical analysis of the data was carried out through a full factorial planning of three levels Box-Behnken 3⁽²⁻⁰⁾ design (BBD) combined with the response surface methodology and (ANOVA). Bioreactors fed in batches and AG / QT (alginate / chitosan) spheres obtained an average removal of 40% of ammoniacal N with average affluent concentrations of 240 mg.L⁻¹. In spheres with *Chlorella* sp. in AG (alginate) the average removals of N-ammonia were in the range of 85.3% in the 1st hour of contact time. In suspended systems, there was cell growth in the N-ammoniacal bands between 47 and 2182 mg.L⁻¹, with an increase of Chlorophyll *a* of 1500% in concentrations of 99 mg.L⁻¹ and removals of up to 88 mg-N in concentrations 798 mg.L⁻¹. It was found that the increase in the percentage of leachate inhibited cell growth. In the continuous bioreactor with *Chlorella* sp. immobilized in AG, removals of P-total, N-ammoniacal, Na²⁺, K⁺ and Mg²⁺ respectively of 63, 42, 28, 49 and 55% were recorded in 2-hour HRT. Phytoremediation was achieved through a combination of mechanisms including bioassimilation, precipitation as a consequence of pH and adsorption in the polymeric matrix. Thus, the results point to the potential of *Chlorella* sp. in the treatment of landfill leachate.

Keywords: percolated liquid; Removal of nutrients; Microalgae; Phytoremediation; Polymeric matrix.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

| | |
|---|----|
| Figura 1. Mecanismos de assimilação de nitrogênio amoniacal e fósforo total pelas microalgas..... | 38 |
| Figura 2. Representação da ligação dos blocos de homopolímeros através de Íons de cálcio, formando o egg-box model..... | 47 |
| Figura 3. Ligação entre AG e QT para formar o complexo alginato-quitosana..... | 48 |

CAPÍTULO 2

| | |
|--|----|
| Figura 1. Eletroforese em gel de agarose de DNA genômico total de <i>Chlorella</i> sp. | 64 |
| Figura 2. Representação da curva de absorbância gerada no NanoDrop para DNA de <i>Chlorella</i> sp. extraído por CTAB..... | 67 |

CAPÍTULO 3

| | |
|---|-----|
| Figura 1. Curva de crescimento da <i>Chlorella</i> sp..... | 89 |
| Figura 2. <i>Chlorella</i> sp. em fase estacionária, ampliação de 400 × (2-A) e) <i>Chlorella</i> sp. imobilizada em esferas alginato de cálcio (2-B) | 90 |
| Figura 3. Comportamento temporal do pH em sistemas com <i>Chlorella</i> sp. imobilizada em diferentes matrizes poliméricas..... | 90 |
| Figura 4. Micrografia da superfície de esfera com <i>Chlorella</i> sp. em aumentos de 500, 50 e 10 µm..... | 92 |
| Figura 5. Remoção de amônia em biorreatores AG/QT com TDH de 4 h..... | 93 |
| Figura 6. Diagrama de Pareto e Superfície de resposta do DOE 2 ⁽²⁻⁰⁾ obtidos para o monitoramento de N-amoniacal..... | 93 |
| Figura 7. Remoção de N-amoniacal por <i>Chlorella</i> sp. imobilizada em AG..... | 95 |
| Figura 8. Diagrama de Pareto e superfície de resposta do DOE 2 ⁽²⁻⁰⁾ obtidos para o monitoramento de N-amoniacal..... | 96 |
| Figura 9. Comportamento temporal da remoção de N-amoniacal e síntese de Oxigênio Dissolvido nos diferentes tratamentos..... | 98 |
| Figura 10. Esferas com algas imobilizadas: entrada; saída 50, 98 e 195 mg.L ⁻¹ de N- amoniacal afluyente..... | 99 |
| Figura 11. MEV de superfície de esferas com algas imobilizadas de entrada (aumento de 60x) e saída do sistema em aumento de 200x..... | 100 |

CAPÍTULO 4

| | |
|--|-----|
| Figura 1. Etapas sequenciais da coleta do LAS até a identificação do fitoplâncton..... | 112 |
| Figura 2. Biorreatores com diferentes concentrações de N-amoniacal afluyente..... | 115 |
| Figura 3. Biorreatores com LAS a 100, 50, 40, 30, 20 ,10% e controle positivo com avaliados a 144 h de monitoração..... | 116 |
| Figura 4. Comportamento da variação temporal da concentração de Clorofila <i>a</i> no controle e diferentes tratamentos..... | 121 |

| | |
|---|-----|
| Figura 5. MSR para N-amoniaco sob influência do tempo e do % de lixiviado na composição do substrato..... | 123 |
| Figura 6. Diagrama de Pareto para interferência do tempo e % de lixiviado na remoção de nitrogênio amoniacal..... | 124 |
| Figura 7. Valores preditos versus observados do modelo matemático aplicado..... | 124 |
| Figura 8. MSR para turbidez sob influência do tempo e do % de lixiviado na composição do substrato..... | 125 |
| Figura 9. Gráfico de Pareto para tempo e % de lixiviado na remoção de N-amoniaco..... | 126 |
| Figura 10. Valores preditos versus observados para do modelo matemático..... | 127 |
| Figura 11. MSR para densidade celular sob influência do tempo e do % de lixiviado na composição do substrato..... | 128 |
| Figura 12. Diagrama de Pareto para tempo e % de LAS no estudo da DC..... | 129 |
| Figura 13. Valores preditos versus observados do modelo matemático de crescimento da <i>Chlorella</i> sp. em percentuais de 10, 40 e 100% de lixiviado..... | 130 |
| Figura 14. Curvas de crescimento da <i>Chlorella</i> sp. em diferentes concentrações de N-amoniaco..... | 129 |
| Figura 15. Remoção de íons por <i>Chlorella</i> sp. nos três tratamentos aplicados..... | 133 |
| Figura 16. Densidade celular média e cinética de crescimento da <i>Chlorella</i> sp. em diferentes substratos..... | 135 |

CAPÍTULO 5

| | |
|--|-----|
| Figura 1. Coleta do LAS, identificação, cultivo e imobilização da <i>Chlorella</i> sp..... | 148 |
| Figura 2. Biorreator com algas imobilizadas alimentado em regime contínuo..... | 151 |
| Figura 3. Remoção de N- amoniacal em biorreatores em regime contínuo..... | 155 |
| Figura 4. Comportamento da remoção temporal de P-Total em BAI..... | 157 |
| Figura 5. Remoção de cátions em BAI e Controle..... | 158 |
| Figura 6. MEV da superfície da esfera com algas imobilizadas..... | 159 |
| Figura 7. Espectrograma da superfície das esferas após ensaios..... | 159 |
| Figura 8. Esferas com <i>Chlorella</i> sp. Imobilizada antes e ao final dos ensaios..... | 162 |
| Figura 9. SR e diagrama de Pareto para o para o BB DOE Full 3 ⁽²⁻⁰⁾ | 164 |
| Figura 10. Remoção de N-Amoniacal em diferentes volumes de esferas..... | 165 |

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Leituras ópticas (Absorbância 260 e 280) do DNA Genômico total extraído de <i>Chlorella</i> sp., pelo método CTAB em triplicata..... | 67 |
|--|----|

CAPÍTULO 3

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Parâmetros utilizados para caracterização química do lixiviado/ Método analítico/ Equipamento..... | 83 |
| Tabela 2. Características operacionais das etapas da pesquisa..... | 86 |
| Tabela 3. Caracterização química dos efluentes usados na composição do substrato..... | 87 |
| Tabela 4. ANOVA DOE 2 ⁽²⁻⁰⁾ com replicata do ponto central para o monitoramento de N-amoniacal..... | 93 |
| Tabela 5. ANOVA DOE 2 ⁽²⁻⁰⁾ com duas replicatas para o monitoramento de N-amoniacal..... | 95 |

CAPÍTULO 4

| | |
|--|-----|
| Tabela 1. Parâmetros monitorados, métodos e equipamentos..... | 114 |
| Tabela 2. Condições operacionais do cromatógrafo iônico..... | 114 |
| Tabela 3. Configuração dos sistemas monitorados..... | 117 |
| Tabela 4. Caracterização Físico-química do lixiviado do ASMJP..... | 119 |

CAPÍTULO 5

| | |
|---|-----|
| Tabela 1. Parâmetros monitorados e configuração do sistema..... | 149 |
| Tabela 2. Características operacionais e parâmetros avaliados do sistema em cada etapa da pesquisa..... | 150 |
| Tabela 3. Parâmetros monitorados, métodos e equipamentos..... | 153 |
| Tabela 4. Caracterização Físico-química do lixiviado do ASMJP..... | 154 |
| Tabela 5. Valores médios de remoção de nutrientes em ensaios com e sem suplementação de fosfato..... | 160 |
| Tabela 6. Matriz de planejamento do BB DOE Full 3 ⁽²⁻⁰⁾ | 163 |
| Tabela 7. Matriz de dados experimentais para o BB DOE Full 3 ⁽²⁻⁰⁾ | 163 |
| Tabela 8. Dados ANOVA para o BB DOE Full 3 ⁽²⁻⁰⁾ | 164 |

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AG- alginato

AGV- Ácidos Graxos Voláteis

APHA- American Public Health Association

ASM-1- Meio ASM-1 estéril

ASMJP- Aterro Sanitário Metropolitano de João Pessoa

ATP- Adenosina Trifosfato

BAI- Biorreator com Algas Imobilizadas

BC- Biorreator Controle

CaCl₂- Cloreto de Cálcio

CERTBIO- Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste.

Cl *a*- Clorofila *a*

CO₂- Dióxido de carbono

CTAB- Brometo de Cetiltrimetilamônio

DBO₅- Demanda Bioquímica de Oxigênio

DQO- Demanda Química de Oxigênio

DCM- Densidade Celular Máxima

DNA- Ácido desoxirribonucleico

EDS- Espectroscopia por Energia Dispersiva

EDTA- Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

EXTRABES- Estação Experimental de Tratamento Biológico de Esgoto Sanitário

LBIOTEC- Laboratório de Biotecnologia

LAS- Lixiviado de Aterro Sanitário

MBB- Meio Basal de Bolds

MEV- Microscopia Eletrônica de Varredura

NH₄⁺- Íon amônio

NTU- Unidade Nefelométrica

P- Fósforo

PCR- Reação em Cadeia de Polimerase

%- Percentual

pH- Potencial Hidrogeniônico

PO₄³⁻- Fosfato

QT- Quitosana

RNA- Ácido ribonucleico

Rpm - Rotações por Minuto

TDH- Tempo de detenção hidráulica

UEPB- Universidade Estadual da Paraíba

UFCG- Universidade Federal de Campina Grande

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| INTRODUÇÃO GERAL | 19 |
| REFERÊNCIAS | 22 |
| OBJETIVOS | 24 |
| ESTRUTURA DA TESE | 25 |
| | |
| CAPÍTULO 1 | 28 |
| 1.1. O Lixiviado de aterro sanitário..... | 29 |
| 1.1.1. Composição Química do Lixiviado de Aterro Sanitário | 30 |
| 1.1.2. Impactos Biológicos de Lixiviados nos ecossistemas | 31 |
| 1.1.3. Nitrogênio e fósforo presentes em lixiviado de aterro sanitário | 33 |
| 1.1.3.1. Nitrogênio..... | 33 |
| 1.1.1.4. Assimilação de nitrogênio por microalgas | 33 |
| 1.1.2. Fósforo..... | 35 |
| 1.2. Imobilização celular | 38 |
| 1.2.1. Adsorção..... | 40 |
| 1.2.2. Flocculação..... | 40 |
| 1.2.3. Ligação covalente | 41 |
| 1.2.4. Ligação cruzada | 41 |
| 1.2.5. Aprisionamento em membranas semipermeáveis | 42 |
| 1.2.6. Aprisionamento em gel..... | 42 |
| 1.2.6.1. Alginato e quitosana como matrizes imobilizantes | 46 |
| REFERÊNCIAS | 48 |
| | |
| CAPÍTULO 2 | 57 |
| 2.1. INTRODUÇÃO..... | 60 |
| 2.2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 62 |
| 2.2.1. Coleta, identificação do fitoplâncton e cultivo da <i>Chlorella</i> sp. | 62 |
| 2.2.2. Isolamento do DNA da <i>Chlorella</i> sp. | 64 |
| 2.2.3. Análise do DNA por eletroforese em gel de agarose | 65 |
| 2.2.4. Análise do DNA por espectrofotometria..... | 65 |
| 2.2.5. Amplificação do DNA de <i>Chlorella</i> sp. por PCR | 66 |
| 2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 66 |

| | |
|---|----|
| 2.3.1. Amplificação por PCR da região 18S do DNAr de <i>Chlorella</i> sp..... | 70 |
| 2.4. CONCLUSÃO..... | 70 |
| REFERÊNCIAS | 71 |

| | |
|---|-----|
| CAPÍTULO 3 | 74 |
| 3.1. INTRODUÇÃO..... | 76 |
| 3.2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 79 |
| 3.2.1. Considerações Gerais | 79 |
| 3.2.2. Reagentes | 80 |
| 3.2.3. Isolamento, Cultivo e curva de crescimento da <i>Chlorella</i> sp..... | 80 |
| 3.2.4. Procedimentos de imobilização da <i>Chlorella</i> sp. / Preparação do substrato de alimentação..... | 81 |
| 3.2.5. Caracterização dos biorreatores e das condições de realização do Experimento... | 84 |
| 3.2.6. Análise Estatística | 86 |
| 3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 86 |
| 3.3.1. Caracterização química do LAS e do ED..... | 86 |
| 3.3.2. Curva de crescimento da <i>Chlorella</i> sp. | 88 |
| 3.3.3. Estudo do pH..... | 90 |
| 3.3.4. MEV das esferas com algas imobilizadas | 91 |
| 3.3.5. Etapa I - Remoção de N- amoniacal por <i>Chlorella</i> sp. imobilizada em esferas AG/QT..... | 92 |
| 3.3.6. Etapa II - Remoção de nitrogênio amoniacal de ED+LAS por <i>Chlorella</i> sp. imobilizada em esferas AG..... | 95 |
| 3.3.7. Etapa III- Remoção de N-amoniacal de lixiviado de aterro sanitário por <i>Chlorella</i> sp. imobilizada em esfera AG..... | 97 |
| 3.4. CONCLUSÃO..... | 101 |
| REFERÊNCIAS | 102 |

| | |
|---|-----|
| CAPÍTULO 4 | 107 |
| 4.1. INTRODUÇÃO..... | 110 |
| 4.2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 111 |
| 4.2.1. Considerações Gerais | 111 |
| 4.2.2. Identificação do fitoplâncton..... | 111 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 4.2.3. | Isolamento e cultivo..... | 112 |
| 4.2.4. | Reagentes | 113 |
| 4.2.5. | Monitoramento e métodos analíticos aplicados | 113 |
| 4.2.6. | Etapa I - Produção de Biomassa em diferentes concentrações afluentes de N-Amoniacal..... | 115 |
| 4.2.7. | Etapa II – Crescimento de <i>Chlorella</i> sp. em diferentes diluições de LAS | 115 |
| 4.2.8. | Etapa III - Testes de avaliação da toxicidade do nitrogênio amoniacal | 116 |
| 4.2.9. | Análise estatística..... | 117 |
| 4.3. | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 118 |
| 4.3.1. | Etapa I - Produção de biomassa em diferentes concentrações de N-amoniacal afluentes | 120 |
| 4.3.2. | Etapa II- Crescimento de <i>Chlorella</i> sp. em diferentes diluições de LAS | 121 |
| 4.3.2.1. | Oxigênio dissolvido | 122 |
| 4.3.2.2. | N-amoniacal..... | 122 |
| 4.3.2.3. | Turbidez..... | 125 |
| 4.3.2.4. | Densidade celular | 127 |
| 4.3.3. | Etapa III - Testes para avaliação da toxicidade do Nitrogênio amoniacal | 131 |
| 4.3.3.1. | Remoção de Nitrogênio amoniacal..... | 131 |
| 4.3.3.2. | Remoção de Íons | 132 |
| 4.3.3.3. | Turbidez..... | 133 |
| 4.3.3.4. | O crescimento da <i>Chlorella</i> sp. em diferentes substratos..... | 134 |
| 4.4. | CONCLUSÃO..... | 136 |
| | REFERÊNCIAS | 137 |
| | | |
| | CAPÍTULO 5 | 140 |
| 5.1. | INTRODUÇÃO..... | 144 |
| 5.2. | MATERIAL E MÉTODOS..... | 146 |
| 5.2.1. | Considerações Gerais | 146 |
| 5.2.2. | Isolamento da espécie dominante | 147 |
| 5.2.3. | Imobilização | 148 |
| 5.2.4. | Monitoração do sistema..... | 149 |
| 5.2.4.1. | Etapa I- Remoção de nutrientes em concentração de N-amoniacal afluyente controlada | 150 |
| 5.2.4.2. | Etapa II - Remoção de nutrientes com e sem adição de fosfato no substrato... | 151 |
| 5.2.4.3. | Etapa III - Remoção de N- amoniacal em diferentes volumes de recheio | 152 |
| 5.2.5. | Métodos analíticos aplicados | 152 |

| | |
|--|------------|
| 5.2.6. Estatística | 153 |
| 5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 153 |
| 5.3.1. Etapa I: Remoção de nutrientes em função da concentração de N-amoniaco afluente | 155 |
| 5.3.1.1 Remoção de P-Total | 156 |
| 5.3.1.2. Remoção de Íons | 157 |
| 5.3.1.3. MEV e EDS das esferas com algas imobilizadas | 158 |
| 5.3.2. Etapa II - Remoção de Nutrientes com e sem adição de suplementação | 160 |
| 5.3.2.1. Remoção de N-amoniaco..... | 160 |
| 5.3.2.2. Turbidez..... | 161 |
| 5.3.3. Etapa III- Remoção de N-amoniaco em diferentes volumes de recheio | 162 |
| 5.4. CONCLUSÃO..... | 167 |
| REFERÊNCIAS | 168 |
| CONCLUSÃO GERAL | 171 |
| RECOMENDAÇÕES..... | 172 |
| APÊNDICES..... | 173 |

INTRODUÇÃO GERAL

O desenvolvimento industrial e tecnológico tem sido usado como argumento para a utilização predatória dos recursos naturais pela sociedade, determinando assim, um consumo desmedido de bens e serviços, característico do modelo capitalista. Como consequência, a problemática que se desenha, aponta para a geração excessiva dos Resíduos Sólidos Urbanos (RSU), sem preocupar-se contudo, com o controle, produção, armazenamento, transporte, tratamento e destinação final dos mesmos, etapas que regem a gestão de resíduos sólidos em consonância com os melhores princípios de preservação do ambiente, da saúde pública e da economia. Segundo Leite et al. (2010) a composição gravimétrica dos resíduos sólidos urbanos produzidos pela população brasileira é constituída basicamente de matéria orgânica putrescível, papel, papelão, plásticos de diferentes fontes de produção e utilização, vidro, material ferroso e não ferroso e de diferentes outros tipos de resíduos, os denominados rejeitos.

Considerando que, do total de resíduos sólidos urbanos produzidos, cerca de 57% (percentagem em peso) corresponde à matéria orgânica putrescível, portanto, com possibilidade de geração de lixiviado e comparando este panorama com o que determina a Lei 12.205/2010 em seu capítulo II, Art. 3º, ítem VIII, acerca da disposição ambientalmente adequada para o RSU, fica evidente não ter havido ainda um alinhamento entre legislação e gestão pública dos resíduos no esta da Paraíba.

O panorama atual indica que devem ser repensadas as estratégias até agora adotadas, dando ao problema a dimensão exigida na busca da implementação de ações na resolução da geração, disposição e tratamento de resíduos sólidos, uma vez que a fração biodegradável disposta em aterros controlados, lixões e terrenos baldios produz lixiviado, que é um resíduo líquido de difícil tratamento e alto poder contaminante para os ecossistemas em geral.

O lixiviado de aterro sanitário é uma água residuária altamente poluída constituída por compostos orgânicos xenobióticos tóxicos, taninos, ácidos graxos, ácidos húmicos e fúlvicos. Apresenta elevada DQO ($5000-20.000 \text{ mgL}^{-1}$) e baixas razões de DBO_5/DQO ou $\text{DBO}_5/\text{NH}_4^+-\text{N}$, indicando a presença de uma quantidade significativa de material biologicamente inerte. O componente inorgânico encontrado em altas concentrações é o nitrogênio amoniacal, na faixa de $3000-5000 \text{ mg.L}^{-1}$ (NAVEEN et al. 2016).

A análise química do lixiviado revela também, a presença de vários metais pesados tóxicos tais como: Ag, Hg, Cd, Mn, Cu e Zn (KUMARI et al. 2016). Metais pesados a exemplos do arsênio, chumbo e mercúrio em lixiviados de aterros, tem sido uma preocupação emergente

da comunidade científica. Reconhecidamente, algumas espécies constituem micronutrientes essenciais, podendo entretanto, apresentar efeitos tóxicos agudos ou crônicos para os organismos, quer por interferência metabólica, quer por mutagênese, quando estão presentes em concentrações elevadas (GOVIND e MADHURI, 2004).

Em análise, como resultante da complexidade do processo de biodegradação dos resíduos que ocorre no interior da célula em um aterro sanitário, o lixiviado surge como um subproduto de matriz físico-química e microbiológica complexa e variada constituindo-se por alguns compostos, com elevada magnitude, a exemplo do nitrogênio amoniacal, que potencializa os efeitos poluentes dessa água residuária, tornando seu tratamento e monitoração um desafio sanitário de grande monta.

Em paralelo à esse panorama, a aplicação de microalgas no tratamento de águas residuárias tem sido considerada uma alternativa muito promissora. Algumas das principais razões podem ser elencadas:

“(a) tratamento de baixo custo com (b) baixo requisitos de energia, podendo estes ser alcançados através da otimização do sistema, (c) demanda reduzida de área, (d) reduzida concentração orgânica e de nutrientes, (e) não requer produtos químicos adicionais, (f) baixa formação de lodo em comparação ao tratamento aeróbio convencional, e (g) biomassa de algas pode ser usada para biocombustível ou formação de produto de valor agregado. Além destes aspectos operacionais, as microalgas através de sua fisiologia, são eficientes na remoção de nutrientes, como nitrogênio (N) e fósforo (P), bem como a remoção de minerais e reduzindo a carga orgânica. Este último inclui o remoção de compostos fenólicos e aromáticos. E como vantagem adicional, as microalgas são capazes de remover com eficiência metais pesados (HMs), bem como contaminantes emergentes (CEs), mesmo quando contidos em concentrações de traços (MAITY et al. 2014; WANG et al. 2017)”.

A biorremediação a partir de microalgas, visando a recuperação de recursos de resíduos líquidos, possibilita a rápida ciclagem e reaproveitamento de alguns elementos químicos no ambiente, reduzindo sobremaneira o potencial poluidor destes. À luz de Misha et al. (2018), o uso de microalgas no tratamento de águas residuárias (fitorremediação) tem sido uma abordagem ecológica importante no combate à poluição ambiental.

À vista disso, o nitrogênio e o fósforo são macronutrientes essenciais à fisiologia das algas. Na concepção de Whitton et al. (2015) o nitrogênio é o segundo macronutriente mais importante e essencial para o crescimento de microalgas e, como tal, poderia influenciar diretamente em seu rendimento de produção. O nitrogênio pode ser encontrado sob muitas formas nas águas residuárias, sendo geralmente assimilado por microalgas como um substrato inorgânico na preferência de íon amônio (NH_4^+). Diferentes águas residuárias contêm elevadas concentrações de N- amoniacal (100 e 9000 mg. L^{-1}) podendo ser usadas com sucesso para a produção de microalgas. Neste sentido, as estações de tratamento de águas residuárias

apresentam uma das maiores oportunidades para recuperação de nitrogênio devido as altas concentrações de amônio íons (YE et al. 2018).

Consoante SOLOVCHENKO et al. (2016), o fósforo é um macronutriente essencial para o crescimento de microalgas, participa na formação de DNA, RNA, ATP e fosfolipídios na biomassa algal. É importante destacar que o fósforo é um recurso de lenta ciclagem por não apresentar forma gasosa. Desta forma sua recuperação e reciclagem são consideradas vitais para uso futuro, sendo justificável sua recuperação das águas residuárias através das microalgas preferencialmente na forma de ortofosfatos (PO_4^{3-}).

As microalgas mais investigadas no tratamento de águas residuárias são as espécies do gênero *Chlorella*. Esse gênero é representado por algas unicelulares, com formato esférico, globular ou elipsoidal, não móvel, que podem atingir diâmetros entre 2,0 μm e 10,0 μm . Algumas espécies de *Chlorella* são marinhas e outras são dulcícolas. Sua composição média é de aproximadamente 20% de gordura, 45% de proteína, 20% de carboidrato e 10 % de minerais e vitaminas (PHUKAN et al., 2011). Bicudo e Menezes (2006) caracterizando a *Chlorella Beijerinck*, pontuam que são indivíduos sempre solitários e de vida livre, a célula é, em geral, esférica, elipsoidal ou ovoide, mas também reniforme ou um pouco assimétrica, a parede celular é bem distinta, porém delgada.

A imobilização de microalgas, confinamento de células vivas dentro de um gel moldado em esferas, supera muitas barreiras operacionais características dos sistemas livres a exemplo da saída de células junto com efluente tratado e necessidade do uso de coagulantes (MALLICK 2002). Esses géis são hidrofílicos, com pequenos poros para permitir a difusão de águas residuárias para as células de microalgas aprisionadas (DE-BASHAN & BASHAN, 2010). A imobilização oferece a oportunidade de semear um biorreator com uma biomassa escolhida em elevadas densidades e promove a proteção contra a predação e a contaminação da cultura de microalgas (PARK et al. 2010).

Nesse panorama, a aplicação de sistemas de algas imobilizadas, visando a remoção de fósforo e nitrogênio de águas residuárias, é uma tecnologia viável que está sendo investigada, considerando que, os resultados obtidos com o confinamento desses microrganismos, em uma região restrita do biorreator, são indicativos de remediação e boa qualidade sanitária dos efluentes.

REFERÊNCIAS

- BICUDO, C.E.M.; MENEZES, M. Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições. **Rima**, 508p, 2006.
- BRASIL. **Lei nº 12.305 de 2 de Agosto de 2010**. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos, altera a Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998 e dá outras providências, Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2 de Agosto de 2010.
- DE-BASHAN, L. E. & BASHAN, Y. Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1611–1627. 2010.
- GOVIND, P, & MADHURI, S. “Heavy metals causing toxicity in animals and fishes.” **Research Journal of Animal, Veterinary and Fishery Sciences**, v.2, p. 17-23, 2004.
- KUMARI, M.; POOJA, G.; TRAKUR, I, S. “Landfill leachate treatment using bactoalgal co-culture: An integrated approach using chemical analyses and toxicological assessment,” **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.128, 44-51, 2016.
- IBGE – **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. (2013) Indicadores de desenvolvimento sustentável: Brasil 2010. Rio de Janeiro: Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Recuperado em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv59908.pdf>.
- LEITE, V. D.; SILVA. S.A.; LOPES, W.S; SOUSA, J.T. Resíduos sólidos urbanos no estado da Paraíba: aspectos conjunturais. **I Simpósio Nordeste de Saneamento Ambiental**. João Pessoa, Paraíba, 2010.
- MACKIE, A. R.; MACIERZANKA, A.; AARAK, K.; RIGBY, N. M.; PARKER, R.; CHANNEL, G. A.; HARDING, S. E.; BAJKA, B. H. Sodium alginate decreases the permeability of intestinal mucus. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 749-755, 2016.
- MAITY, J.P.; BUNDSCHUH J.; CHEN, C.Y.; BHATTACHARYA, P. Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: present and future perspectives e a mini review, **Energy** , v. 78 p. 104-113, 2014.
- MALLICK, N. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review. **Biometals**, v.15, p. 377-390, 2002.
- MISHA, A.; MEDHI, K.; MAHESHWARI, N.; SRIVASTAVA, S.; TRAKUR, I, S. Biofuel production and phycoremediation by *Chlorella* sp. ISTLA1 isolated from landfill site. **Bioresource Technology**, v. 253, p. 121-129, 2018.
- NAVEEN, B.P.; MAHAPATRA, D.M.; SITHARAM, T.G.; SIVAPULLAIAH, P.V.; RAMACHANDRA, T.V. Physico-chemical and biological characterization of urban municipal landfill leachate, **Environ. Pollut.**, v. 220, p. 1–12, 2016.

PARK, J. B.; K., CRAGGS, R. J.; SHILTON, A. N. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production, **Bioresour. Technology**, v. 102, p. 35–42, 2010.

PHUKAN, M. M.; CHUTIA, R.S.; KONWAR, B.K.; KATAKI, R. Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock. Special Issue of Energy from algae: Current status and future trends. **Applied Energy, Elsevier**, v. 88, p. 3307– 3312, 2011.

SOLOVCHENKO, A.; VERSCHOOR, A.M.; JABLONOWSKI, N.D.; NEDBAL, L. Phosphorus from wastewater to crops: an alternative path involving microalgae, **Biotechnol. Adv.**, v. 34, p. 550- 564, 2016.

WANG, W; LIU, X; XIE, Y; ZHANG, H.; YU, W; XIONG, Y; XIE, W; MA, X. Microencapsulation using natural polysaccharides for drug delivery and cell implantation. **Journal of Materials Chemistry**, v.16, p. 3252-3267, 2006.

WANG, J.H.; ZHANG, T.Y.; DAO, G.H.; XU, X.Q.; WANG, X.X.; HU, H.Y., Microalgae-based advanced municipal wastewater treatment for reuse in water bodies, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.101, p. 2659-2675, 2017.

WHITTON, R.; OMETTO, F.; PIDOU, M.; JARVIS, P, VILLA, R.; JEFFERSON, B. Microalgae for municipal wastewater nutrient remediation: mechanisms, reactors and outlook for tertiary treatment, **Environ. Technol. Rev.** , v. 4, p. 133-148, 2015.

YE, Y.; NGO, H.H.; GUO, W.; LIU, Y.; CHANG, S.W.; NGUYEN, D.D.; LIANG, WANG, H. A critical review on ammonium recovery from wastewater for sustainable wastewater management, **Bioresour. Technol.**, v. 268, p. 749-758, 2018.

OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficiência da Chlorophyceae *Chlorella* sp. na remoção de nutrientes do lixiviado de aterro sanitário, estando as células em sistemas suspensos e imobilizados em matriz de alginato de cálcio em biorreatores tubulares alimentados em regimes de batelada e contínuo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Propor um protocolo para a extração do DNA da *Chlorella* sp. isolada do lixiviado do ASMJP- PB, visando sua amplificação com primers DNAr 18S para posterior sequenciamento molecular;
- Avaliar o desempenho da Chlorophyceae, *Chlorella* sp. imobilizada em matriz polimérica na remoção de nitrogênio amoniacal de lixiviado de aterro sanitário em biorreatores de diferentes geometrias alimentados em regime de batelada;
- Investigar qual a melhor concentração de N-amoniacal de lixiviado de aterro sanitário para o crescimento da *Chlorella* sp. na remoção de nitrogênio amoniacal em sistemas suspensos alimentados em regime de batelada;
- Investigar a eficiência da *Chlorella* sp. imobilizada em matriz de alginato no tratamento de lixiviado de aterro sanitário em fotobiorreator alimentado em regime contínuo.

ESTRUTURA DA TESE

Composta de cinco capítulos, a presente tese procurou cobrir de forma abrangente a temática da remoção de nutrientes através do aparelho fisiológico das microalgas, estando organizada da seguinte forma:

Capítulo 1- Consiste numa revisão de literatura versando acerca o Lixiviado de Aterro Sanitário, com enfoque na complexidade química desse resíduo líquido e os múltiplos desafios que seu tratamento entrega à academia. Foi abordada a aplicação da fitorremediação, com foco principal na tecnologia das algas imobilizadas no tratamento de águas residuárias. Este capítulo serviu de subsídio para os capítulos seguintes.

Capítulo 2- Este capítulo foi elaborado no formato de artigo científico. O estudo visou desenvolver um protocolo de extração e quantificação do DNA da *Chlorella* sp. isolada do lixiviado do aterro sanitário metropolitano de João Pessoa-PB, para subsequente identificação molecular da microalga aplicada na fitorremediação do LAS.

Capítulo 3- Este capítulo foi elaborado na forma de artigo científico. Nele, está apresentada a caracterização físico-química do lixiviado do aterro sanitário da região metropolitana de João Pessoa- PB. Foi realizado um estudo da aplicação da *Chlorella* sp. imobilizada em diferentes matrizes poliméricas na remoção de nitrogênio amoniacal do lixiviado e do esgoto doméstico em biorreatores tubulares alimentados em batelada.

Capítulo 4- Este capítulo foi elaborado no formato de artigo. O propósito da pesquisa foi avaliar o potencial de remoção de N- amoniacal do lixiviado de aterro sanitário por *Chlorella* sp. em sistemas livres, em biorreatores cônicos alimentados em batelada. Avaliou-se ainda, o crescimento e a inibição da cepa, exposta a diferentes magnitudes de nitrogênio amoniacal.

Capítulo 5- Este capítulo foi elaborado no formato de artigo. O estudo pretendeu investigar a eficiência da *Chlorella* sp. imobilizada em alginato de cálcio em concentração de 4%, na remoção de nutrientes (N e P) de lixiviado de aterro sanitário em biorreator tubular alimentado em regime contínuo.

A seguir, estão listados os artigos publicados em revistas indexadas e anais de congressos nacionais e internacionais, durante o desenvolvimento do presente trabalho.

SILVA, M.C.C.P.; LEITE, V.D.; SOUSA, J.T.; PEARSON, H.W. Remoção de nutrientes de efluente secundário oriundo de filtro de areia usando a microalga *Chlorella* sp. imobilizada em matriz de alginato de cálcio. **9º Encontro Internacional das Águas, Universidade Católica de Pernambuco**, 2017.

SILVA, M, C, C, P.; LEITE, V, D.; ALBUQUERQUE, M, V, C.; SILVA JUNIOR, J, F. Tratamento de lixiviado de aterro sanitário aplicando microalgas em meio não suplementado de nutrientes. **Terra – Habitats Urbanos e Rurais**. p.1398-1409, 2018.

SILVA, M. C. C. P.; CARTAXO, A. S. B.; PEARSON, H. W.; LEITE, V. D. Tratamento de lixiviado de aterro sanitário aplicando microalgas em biorreatores alimentados em batelada. In: **IV Congresso Nacional de Pesquisa e Ensino em Ciências**. Tecnologia, investigação, sustentabilidade e os desafios do século XXI, 2019.

SILVA, M. C. C. P.; PEARSON, H. W.; CARTAXO, A. S. B.; COSTA, E. M. F.; DO O, K. D. S.; LEITE, V. D. **Avaliação do crescimento da *Chlorella* sp. em lixiviado de aterro sanitário em regime de batelada**. In: X Simpósio Brasileiro de Engenharia Ambiental e Sanitária. X SBEA. **X Simpósio Brasileiro de Engenharia Ambiental e Sanitária**, 2019.

SILVA, M. C. C. P.; PEARSON, H. W.; SOUSA, J. T.; DO O, K. D. S.; CANTO, C. S. A.; LEITE, V. D. Remoção de nitrogênio amoniacal de lixiviado de aterro sanitário aplicando *Chlorella* sp. imobilizada em matriz de alginato de cálcio em reatores tubulares. In: X Simpósio Brasileiro de Engenharia Ambiental e Sanitária. X SBEA. **X Simpósio Brasileiro de Engenharia Ambiental e Sanitária**, 2019.

SILVA, M.C.C.P.; CARTAXO, A.S.B.; SOUSA, A.R.; PEARSON, H.W.; LEITE, V.D. "Remoção de nitrogênio amoniacal de lixiviado de aterro sanitário aplicando *Chlorella* sp. em biorreator alimentado em fluxo contínuo". Anais I CONIMAS e III CONIDIS. **Realize Editora**, 2019.

SILVA, M.C.C.P.; SOUSA, J.T.; PEARSON, H.W.; ALBUQUERQUE, M.V.C.; GOMES, L.S.; LEITE, V.D. Estabilidade do alginato de cálcio como matriz imobilizante da *Chlorella* sp. no tratamento de efluente secundário- As Regiões Semiáridas e suas Especificidades 2- **Editora Atena**, p. 165-174, 2019.

SILVA, M.C.C.P.; ALBUQUERQUE, M.V.C.; CARTAXO, A.S.B.; CANTO, C.S.A.; PEARSON, H.W.; LOPES, W.S.; LEITE, V.D. Caracterização físico-química do lixiviado do aterro sanitário metropolitano de João Pessoa-PB. **Anais do Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, v. 7, p.154-161, Congestas 2019.

SILVA, M.C.C.P.; ALBUQUERQUE, M.V.C.A.; CARTAXO, A.S.B.; DANTAS, G.D.; PEARSON, H.W.; LOPES, W.S.; LEITE, V.D. Avaliação do crescimento da microalga *Chlorella* sp. em lixiviado de aterro sanitário em sistemas alimentados em batelada. **Anais do Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, v. 7, p. 162- 169, Congestas 2019.

SILVA, M.C.C.P.; ALBUQUERQUE, M.V.C.; CARTAXO, A.S.B.; CANTO, C.S.A.; PEARSON, H.W.; LOPES, W.S.; LEITE, V.D. Remoção de nitrogênio amoniacal de esgoto doméstico e lixiviado de aterro sanitário usando microalgas imobilizadas. **Anais do Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, v.7, p.170-177, Congestas 2019.

SILVA, M.C.C.P.; ALBUQUERQUE, M.V.C.; RODRIGUES, R. M.M.; CARTAXO, A.S.B.; LOPES, W.S.; PEARSON, H.W.; CAMPOS, M.A.; LEITE, V.D. Tratamento de lixiviado de aterro sanitário aplicando microalgas em biorreatores alimentados em batelada. **Brazilian Journal**, v. 6, n. 8, p. 61722- 61733, 2020.

SILVA, M.C.C.P.; ALBUQUERQUE, M.V.C.; RODRIGUES, R. M.M.; RAMOS R.O, SÁTIRO.; J, R, LOPES.; W.S, PEARSON.; H.W, LEITE, V.D. Remoção de nitrogênio amoniacal por *Chlorella* sp. em diferentes diluições de lixiviado de aterro sanitário. **Brazilian Journal** v. 6, n. 11, p. 86620- 86631, 2020.

SILVA, M.C.C.P.; LEITE, V.D.; ALBUQUERQUE, M.V.C.; CARTAXO, A. S. B.; RAMOS R.O.; LOPES, W.S. Tratamento de lixiviado de aterro aplicando *Chlorella* sp. imobilizada em diferentes matrizes poliméricas. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 12, p. e7691210865, 2020.

CAPÍTULO 1

O LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO E A TECNOLOGIA DAS MICROALGAS IMOBILIZADAS

1.1. O Lixiviado de aterro sanitário

Aterro sanitário é uma tecnologia de disposição final de resíduos sólidos urbanos no solo. Essa tecnologia utiliza princípios de engenharia civil e sanitária para espalhar, compactar e cobrir com terra diariamente os detritos. Nesse sentido, com o objetivo de proporcionar o confinamento seguro desses efluentes, evitando dessa forma, riscos à saúde pública e minimizando os impactos ao meio ambiente. Sua construção deve impermeabilizar o solo para que o lixiviado não atinja os lençóis freáticos, contaminando as águas. Precisa também drenar o lixiviado, retirando-o do aterro, realizando ainda, a drenagem dos gases, principalmente o carbônico, o metano e o sulfídrico (CETESB, 2010).

A disposição dos resíduos sólidos urbanos, em aterros sanitários, tem sido amplamente utilizada no Brasil. Contudo, a maior desvantagem deste método é a necessidade de área ampla e de exigência do tratamento do lixiviado gerado a partir da fração orgânica putrescível adicionada às águas pluviais. É importante também destacar os problemas advindos do despejo de nitrogênio e fósforo, que surgem através do vazamento de lixiviado de aterro sanitário nos corpos aquáticos naturais. Ocasionalmente assim, pontos de grande preocupação, visto que componentes dessa natureza promovem a redução da concentração de oxigênio dissolvido, a eutrofização, provocando desta forma, o *bloom* da microbiota autotrófica, comprometendo a qualidade da água.

Segundo a Política Nacional de Resíduos Sólidos Urbanos (BRASIL, 2010) apenas os rejeitos devem ser destinados aos aterros sanitários, entretanto, grande quantidade de resíduos sólidos (secos e úmidos) é direcionada a esses locais (LEITE et al., 2006). No entanto, a redução da disposição dos resíduos sólidos urbanos nos aterros sanitários é altamente dependente da separação na fonte desses resíduos, etapa esta, que é pouco praticada (AL-KHATIB et. al., 2010).

Nesse contexto, os números acerca da problemática da geração de RSU são atualizados e redimensionados a cada ano, em todo o território brasileiro. Conforme o Panorama de Resíduos Sólidos do Brasil (ABRELPE, 2018-2019), na região Nordeste, durante o ano de 2018, foram geradas 53.975 toneladas/dia de RSU (Resíduos Sólidos Urbanos), representando uma produção per capita de 0,951 g/habitante/dia (g/hab.dia^{-1}), das quais, apenas 81,1% foram coletados. Deste montante coletado, 64,4% (28.183 toneladas diárias) ainda são destinados em lixões e aterros controlados, os quais não oferecem proteção adequada ao meio ambiente e à

saúde pública. Neste panorama sanitário, a contaminação do solo e do lençol freático são, indiscutivelmente, problemas ambientais vigentes de amplas dimensões.

Consoante estimativa publicada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o número da população da cidade de Campina Grande- PB, no ano de 2017, foi de 407.472 habitantes. Considerado a destinação dos RSU supracitada, e ainda uma produção per capita/dia na cidade de 0,9L de lixiviado, conforme Farias (2010), tem-se uma produção de 367 m³.dia⁻¹ de lixiviado na cidade de Campina Grande.

1.1.1 Composição Química do Lixiviado de Aterro Sanitário

Lixiviado de aterro sanitário é considerado uma água residuária de alta força iônica devido a nutrientes inorgânicos dissolvidos, o que pode levar à salinidade com aumento dos níveis de íons cloreto (~ 5g Cl⁻. L⁻¹), sais totais dissolvidos e elevada condutividade em função da presença de substâncias dissolvidas que se dissociam em ânions e cátions (CHENG et al.,2013; KJELDSEN et al., 2002). Em se tratando de lixiviado de aterramento de resíduos sólidos urbanos identifica-se concentração elevada de matéria orgânica (biodegradável ou refratária), elevada concentração de nitrogênio amoniacal, baixa relação C/N, bem como significativas quantidades de metais pesados (OULEGO et al., 2016).

A complexa composição do lixiviado dificulta seu tratamento, desafiando os pesquisadores na busca de proposições que sejam eficientes na melhoria da qualidade sanitária desse percolado. A partir de estudos de bioensaios usando diferentes organismos de teste, a toxicidade do lixiviado foi monitorada e pode-se inferir que de todos os compostos tóxicos que permanecem no resíduo estabilizado, o nitrogênio amoniacal, em suas formas iônica e livre, foi identificado como um dos principais tóxicos para os organismos vivos (CHENG et al.,2013; KJELDSEN et al., 2002; OSADA et al., 2011)

De acordo com KJELDEN e CHRISTENSEN (2001) e KJELDSEN et al. (2002), os constituintes do lixiviado podem ser divididos em quatro grupos:

I) Matéria Orgânica Dissolvida (MOD): expressa como Demanda Química de Oxigênio (DQO) ou Carbono Orgânico Total (COT), incluindo CH₄, ácidos graxos voláteis (em particular na fase ácida) e muitos compostos recalcitrantes, por exemplo, compostos húmicos e fúlvicos;

II) Macronutrientes Inorgânicos: cálcio (Ca), magnésio (Mg), sódio (Na), potássio (K), amônio (NH₄⁺), ferro (Fe), manganês (Mn), cloretos (Cl⁻), sulfato (SO₄²⁻), bicarbonato (HCO₃⁻) e fósforo (P);

III) Metais potencialmente tóxicos: cádmio (Cd³⁺), cromo (Cr³⁺), cobre (Cu²⁺), chumbo (Pb²⁺), níquel (Ni²⁺) e zinco (Zn²⁺);

IV) Compostos Orgânicos Xenobióticos: que incluem uma variedade de hidrocarbonetos halogenados, compostos fenólicos, álcoois, aldeídos, cetonas e ácidos carboxílicos, além de outras substâncias caracteristicamente tóxicas. Outros compostos podem ser encontrados em menor concentração, como boro (B), arsênio (As), selênio (Se), bário (Ba), lítio (Li), mercúrio (Hg) e cobalto (Co).

O lixiviado de aterro sanitário é gerado através do processo de biodegradação da matéria orgânica presente nos resíduos sólidos e a infiltração de água de chuva na massa dos resíduos (PERTILE, 2013; HETKA, 2016). Enquanto na concepção de Peng (2013), lixiviado é um líquido altamente contaminado que resulta de um grupo de processos ocorridos dentro de células de aterro: percolação da água da chuva, acumulação de umidade e degradação bioquímica. Sua composição química é bastante variável, apresentando altas concentrações de nitrogênio amoniacal, matéria orgânica dissolvida, compostos recalcitrantes, metais pesados e poluentes tóxicos.

1.1.2. Impactos Biológicos de Lixiviados nos ecossistemas

Para dar condições de lançamento do lixiviado nos corpos receptores, é necessário o tratamento que pode ser tanto físico, químico quanto biológico (RENOU et al., 2008), ou combinações de ambos os tratamentos para atender à legislação brasileira.

Por essa razão, o lixiviado, por possuir caráter altamente tóxico, deve ser submetido a tratamentos adequados antes de ser lançado ao ambiente ou a redes coletoras de esgoto. Dentre os métodos mais utilizados destacam-se o tratamento biológico, a recirculação em aterros sanitários e o tratamento físico-químico (NAKAMURA, 2012).

Além disso, o vazamento de lixiviado nos locais de armazenamento de resíduos sólidos causa a poluição do solo, bem como a poluição das águas subterrâneas, devido ao seu conteúdo de cor escura e pesada, com altos níveis de materiais orgânicos (ácidos graxos e ácidos húmicos), macro substâncias inorgânicas (Ca, Mg, K, NH_4^+ , Fe, Mn, Cl, SO_4^{2-}), substâncias nitrogenadas, metais pesados (Cd, Cr, Cu, Pb, Ni, Zn), sais orgânicos e inorgânicos clorados e mesmo em baixas concentrações, hidrocarbonetos aromáticos, fenóis e pesticidas (WANG et al., 2002, MORAWE et al., 1995). Corroborando com esta afirmação, Nagarajan et al. (2012) identificaram a influência da percolação de lixiviados de aterros sanitários nas águas subterrâneas em uma área próxima a um aterro na Índia. E, ainda, foram registradas elevadas

concentrações dos principais contaminantes, afetando a qualidade das águas, comprometendo assim, o equilíbrio da biota.

Também, a presença de metais pesados como o arsênio, o chumbo e o mercúrio em lixiviados de aterros, tem sido uma preocupação emergente da comunidade científica. Apesar de algumas espécies constituírem micronutrientes essenciais, podem ter efeitos tóxicos agudos ou crônicos para os organismos, sendo por interferência metabólica, ou mesmo, por mutagênese quando estão presentes em concentrações elevadas (GOVIND e MADHURI, 2004).

No Brasil, os processos biológicos são os mais empregados no tratamento de lixiviado de aterro sanitário. Todavia, geralmente ocorrem dificuldades ao utilizar tratamentos biológicos para lixiviado, por causa da vazão e cargas orgânicas muito variáveis, necessidade de uma grande área para implantação, baixa eficiência no tratamento de lixiviado estabilizado, e muitas vezes, o efluente não se enquadra nos padrões estabelecidos pela legislação com necessidade de processos auxiliares que diminuam sua recalcitrância (LANGE et al., 2006 e CASTILHOS JR. et al., 2010). Em geral, o lixiviado de aterro sanitário estabilizado necessariamente precisa de remoção adicional das substâncias orgânicas e amônia, antes do descarte final (CHU et al., 1997).

Alguns fatores afetam a composição do lixiviado, sendo os mais importantes: a composição do resíduo, o local, o projeto, o modo de operação, condições climáticas ao seu redor, além da hidrologia local. A idade do aterro também influencia significativamente na composição química do lixiviado. Os lixiviados gerados em aterros mais novos tendem a ser mais biodegradáveis, enquanto que os de aterros mais antigos são, em geral, mais recalcitrantes (LAK et al., 2012; BILA, 2000).

Diante dos enormes desafios do tratamento do LAS, pesquisas têm focado na implementação de alternativas de tratamento e disposição dos resíduos sólidos urbanos nas quais seja minimizada a geração do LAS, estas se baseiam na implementação de Políticas Públicas e Educacionais que envolvam a população em geral numa discussão mais ampla, que promovam projetos de segregação dos resíduos sólidos na origem, retornando os componentes inorgânicos à cadeia produtiva e ao posterior tratamento da fração orgânica em sistemas anaeróbios, com pequena geração de lodo e liberação de CH_4 e CO_2 .

Atualmente, as principais tecnologias que permitem a remoção das espécies químicas recalcitrantes das águas acarretam custos elevados, dado que estão baseadas em processos físicos ou químicos complexos e que podem envolver a utilização de reagentes caros. Nas opções mais comuns incluem-se a precipitação química, a troca iônica, a filtração de membrana,

mecanismos de adsorção, coagulação-floculação e métodos eletroquímicos (FU e WANG, 2011).

1.1.3. Nitrogênio e fósforo presentes em lixiviado de aterro sanitário

1.1.3.1. Nitrogênio

A química do nitrogênio é complexa devido aos diversos estados de oxidação que o elemento pode assumir na natureza. As formas mais comuns de nitrogênio em águas residuárias são: amônia (NH_3), íon amônio (NH_4^+), gás nitrogênio (N_2), íon nitrito (NO^2) e íon nitrato (NO^3) (SAWYER et al., 2003).

Em lixiviados de aterros sanitários, a forma predominante de nitrogênio é o nitrogênio amoniacal e o bicarbonato de amônio. O bicarbonato de amônio se forma no interior do aterro, em meio anaeróbico quando a amônia formada pela decomposição da matéria orgânica é neutralizada pelo ácido carbônico formado pela reação entre a umidade do resíduo e o dióxido de carbono, também resultante da decomposição da matéria orgânica (CONTRERA, 2008).

AZIZ et al. (2010) avaliam que a existência de uma quantidade elevada de N-NH_4^+ em lixiviados é um dos problemas mais importante rotineiramente enfrentado pelos operadores de aterro. Esta grande quantidade de N-NH_4^+ é estável sob situações anaeróbicas, que tipicamente acumulam no lixiviado concentrações mais elevadas do que 100 mg. L^{-1} , sendo então, altamente tóxicas para os organismos aquáticos.

De acordo com Khan e Mohammad (2014), o excesso de nitrogênio amoniacal no lixiviado pode desencadear o desequilíbrio dos ecossistemas aquáticos, provocando a mortandade de peixes em decorrência da alta toxicidade deste. Nessa lógica, outra questão refere-se ao enriquecimento dos meios aquáticos. Essa consequência é conhecida tradicionalmente como eutrofização, e tem se apresentado como um fenômeno bastante adverso à qualidade dos ecossistemas aquáticos, de difícil controle e remediação destes.

1.1.1.4. Assimilação de nitrogênio por microalgas

Durante o complexo processo fotossintético, as microalgas assimilam além de CO_2 e H_2O , diversos componentes necessários à sua fisiologia. Nas reações luminosas, a clorofila e

outros pigmentos absorvem energia luminosa, empregada na fotólise da água para produção de O_2 , H^+ e elétrons. Os elétrons fluem nas membranas tilacóides do cloroplasto através de uma série de carregadores, incluindo citocromos e quinonas, e são utilizados na redução de NADP em NADPH. Enquanto os prótons são bombeados do lúmen do tilacóide para o estroma do cloroplasto pelas ATP sintases, gerando uma força propulsora para estas enzimas sintetizarem ATP, a partir de ADP e P_i . Desta forma, na presença de luz e água, são produzidos ATP e NADPH, liberando O_2 simultaneamente. Nas reações de fixação de carbono, ou ciclo de Calvin, os ATP e NADPH são empregados na condensação de CO_2 a ribulose-1,5-difosfato para formar 3-fosfoglicerato, reduzido a gliceraldeído-3-fosfato (GAP). O GAP pode ser obtido a partir de compostos orgânicos e utilizado na formação de carboidratos e outras moléculas, e também segue na rota da glicólise para ser oxidado em ácido pirúvico, que por sua vez é convertido em acetil-CoA (HU et al., 2008).

O Nitrogênio é o principal constituinte de proteínas, hormônios, moléculas de transferência de energia, construção de material genético, clorofila e enzimas envolvidas na fotossíntese. É responsável por 1-10% de biomassa seca e sua disponibilidade afeta a fotossíntese de microalgas (JIA e YUAN, 2016). Quando o nitrogênio é fornecido em uma forma oxidada, como nitrato (NO_3^-) ou nitrito (NO_2^-), este é reduzido até amônia antes de ser incorporado em moléculas orgânicas (YANG et al., 2000). O estado de oxidação do átomo de N no nitrato é +5 e na amônia -3, portanto serão necessários 8 elétrons na redução.

A conversão de nitrogênio inorgânico em formas orgânicas pode ser realizada por microalgas eucarióticas via assimilação. Inicialmente, o nitrogênio inorgânico é transportado através da membrana plasmática das células das algas com subsequente redução a nitrato e nitrito por nitrato e nitrito redutase, respectivamente. O próximo passo é a conversão do amônio em aminoácidos (glutamina). Redutase de nitrato utiliza a forma reduzida de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) para transferir dois elétrons na reação para a conversão de nitrato em nitrito. Em seguida, o nitrito é ainda mais reduzido a amônio por nitrito redutase e ferredoxina (Fd) para transferir seis elétrons na reação. Todas as formas inorgânicas de nitrogênio são reduzidas a amônio antes de serem incorporadas em aminoácidos dentro do fluido intracelular. Finalmente, a glutamina sintetase usando glutamato (Glu) e adenosina trifosfato (ATP) facilita a incorporação de amônio em aminoácido glutamina (CAI et al., 2013).

O amônio é considerado uma fonte preferida de nitrogênio para algas verdes. Após seu transporte para o meio intracelular, é geralmente assimilado pelo ciclo glutamina sintetase (GS)-glutamato sintase (GOGAT) e, em algumas algas verdes sob certas condições pela via da NADP-glutamato desidrogenase (GDH) (RICHMOND, 1990).

Quando nitrato e amônio são fornecidos como fonte de nitrogênio, primeiro é consumido o amônio e somente depois o nitrato, sendo o amônio utilizado na síntese de aminoácidos. A incorporação do nitrogênio amoniacal pode ocorrer por duas vias: a catalisada pela enzima glutamina desidrogenase (GDH), que incorpora o nitrogênio amoniacal ao glutamato através de uma aminação redutiva e reversível formando o 2-oxoglutarato e alternativamente, através da glutamina sintetase (GS), onde o nitrogênio amoniacal é incorporado formando glutamina (INOKUCHI & OKADA, 2001; RICHMOND, 1990; YANG et al., 2000; HELLEBUST & AHMAD, 2013).

Algumas microalgas são específicas quanto aos aminoácidos que são capazes de transportar, contudo, as espécies do gênero *Chlorella* são geralmente mais versáteis quanto as suas capacidades de transporte de aminoácidos (KIRK & KIRK 1978a; SAUER et al., 1983; SAUER, 1984). O amônio parece ser a fonte ideal de nitrogênio para a célula, podendo ser utilizado imediatamente para a síntese de aminoácidos. Contudo, se a concentração de amônio for muito alta, ela pode ser tóxica e resultar em crescimento reduzido (COLLOS & HARRISON, 2014). O efeito de maior impacto em microalgas é a lise celular imediata (PROVASOLI, 1958; NAGASOE et al., 2010), ou dentro de algumas horas (ZGUROVSKAYA e KUSTENKO, 1968) após a adição de amônio.

Na visão de Giordano et al. (2003), há efeitos prejudiciais claros de altos níveis de amônio no conteúdo de diatomáceas e cianofíceas, que também se refletem em taxas de crescimento reduzidas. Contudo, esse efeito não é percebido em Chlorophyceae. Klochenko et al. (2003) apontam como sugestão para a maior tolerância de algas verdes a altas amônio, os fatos de elas possuírem maior atividade do sistema GS/GDH e, portanto, o amônio é convertido rapidamente em aminoácidos, ao invés de acumular-se na célula.

1.1.2. Fósforo

O lançamento inadequado de águas residuárias com elevadas concentrações de fósforo em corpos hídricos receptores está vinculado a uma série de alterações ambientais, econômicas e sociais como resultado da eutrofização dos ecossistemas. Estas alterações estão relacionadas ao aumento significativo dos custos: de purificação de água potável, mortes de espécies aquáticas pela desoxigenação da água, a riscos para a saúde humana, em função de toxinas produzidas por cianobactérias, além da constante ameaça para a diminuição da água doce em uma escala global (MAJED et al., 2012).

A remoção do fósforo, constituinte dos mananciais e das águas residuárias através das diversas tecnologias vigentes, previne eutrofização e promove saúde pública. Tecnicamente, o gerenciamento do fósforo das águas residuárias não está completamente estabelecido. As principais tecnologias vigentes incluem abordagens químicas (precipitação química e adsorção), biológicas (sistemas bacterianos, uso macroalgas e microalgas) além de técnicas de fertirrigação (MARONEZE et al., 2014).

Embora esse elemento químico possuir elevado potencial poluidor, ele está entre os elementos químicos listados como essenciais para os seres vivos. Sua função essencial inicia como constituinte das membranas celulares, participando de inúmeros processos metabólicos. Dentro da célula, encontra-se ligado as moléculas que participam dos fundamentais processos ligados à bioenergética celular. O fósforo é também, o centro de armazenamento e processamento de informação genética, fazendo parte das moléculas de RNA e DNA. Desta forma, atua na integridade e reprodução, transporte de nutrientes, metabolismo energético e regulação de processos metabólicos essenciais. Em virtude dessas considerações, o fósforo é um elemento de elevada demanda biológica, o que o torna limitante na natureza (ELSER, 2012).

O crescimento de algas requer fósforo, pois é um elemento essencial necessário para constituintes celulares, como fosfolipídios, nucleotídeos e ácidos nucléicos (MIYACHI et al., 1964). Constatou-se que as microalgas continham aproximadamente 1% de fósforo em peso seco (AZAD & BORCHARDT 1970; GOLDMAN, 1980; KAPLAN et al., 1986). No entanto, em certas condições, as microalgas podem ser desencadeadas para absorver muito mais fósforo do que o necessário para a sobrevivência. Essa absorção adicional de fósforo em níveis mais altos que os requerimentos para o crescimento é armazenada como polifosfato, que pode então ser usado pela célula como um recurso interno quando a concentração externa de fósforo é limitante para o crescimento (KUHL, 1974). Em trabalho de Powell et al. (2009), foi constatado que o polifosfato solúvel em ácido na microalga é dependente da concentração de fosfato nas águas residuais, intensidade de luz e temperatura.

Considerado um nutriente essencial para o crescimento das algas e, sob certas condições, estas absorvem fósforo em excesso das necessidades de crescimento (LARSDOTTER, 2006; POWELL et al., 2009). Sob tais circunstâncias, P é absorvido como ortofosfato e armazenado como grânulos de polifosfato para uso como reserva de crescimento quando houver falta de P no ambiente. Onde o ortofosfato inorgânico não está disponível, as algas absorverão o P orgânico, convertendo-o em ortofosfato na superfície celular através da enzima fosfatase (LARSDOTTER, 2006).

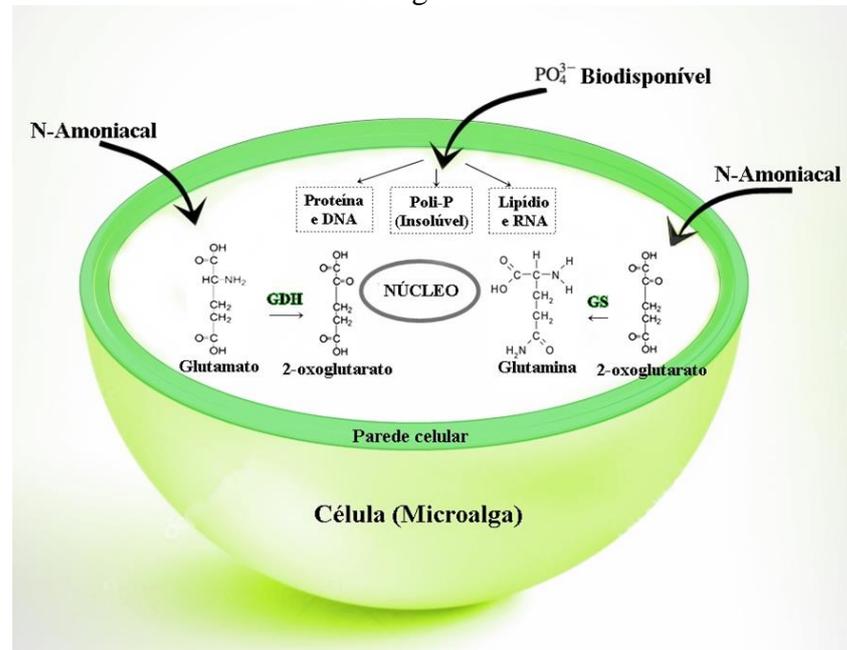
Existem dois mecanismos envolvidos no armazenamento de polifosfato em microalgas: o primeiro é quando as microalgas são privadas de fósforo e, em seguida, re-expostas a ele, o armazenamento consequente é referido como 'excesso de compensação' (AITCHISON e BUTT, 1973; CHOPIN et al., 1997), ou o 'fenômeno overshoot' (CEMBELLA et al., 1984). A compensação excessiva ocorre em sistemas naturais, como lagos, onde as microalgas encontram períodos de fome de fósforo. O outro mecanismo de armazenamento de polifosfato é referido como "absorção de luxo".

O excesso de captação de fósforo é observado mesmo em células de algas sem privação deste, quando expostas a um ambiente com abundância de fósforo, conhecido como "luxo" ou absorção de armazenamento. O excesso de P acumulado é armazenado frequentemente como polifosfato inorgânico (Poli-P). Poli-P é um polímero linear não ramificado de três a várias centenas de resíduos SIP (fosfato inorgânico solúvel) ligados por ligações fosfo-hidreto (SINGH et al., 2018).

Os polifosfatos são moléculas de cadeia longa de comprimento variável e geralmente são divididos em dois tipos: polifosfato solúvel em ácido (ASP) e polifosfato insolúvel em ácido (AISP). Esses são nomeados de acordo com o método de extração química usado para análise. Acredita-se que os polifosfatos solúveis em ácido sejam moléculas de cadeia mais curta e estejam envolvidos no metabolismo (BROWN & SHILTON, 2014), enquanto a AISP são polifosfatos de cadeia mais longa que são usados para armazenamento de fósforo em longo prazo (MIYACHI et al., 1964).

Na concepção de Miyachi et al. (1964), existem pelo menos quatro conjuntos Poly-P conhecidos, denominados A, B, C e D. Os polifosfatos solúveis em ácido (A e C) estão prontamente disponíveis para a síntese de DNA e proteínas, enquanto os polifosfatos insolúveis em ácido (B e D) servem como armazenamento. O fósforo intracelular pode ser usado pelas microalgas para vários processos. As duas principais vias são a produção de polifosfatos e a produção de substâncias, como fosfolipídios ou RNA, que são necessárias para o metabolismo. Isto significa que a quantidade líquida de fósforo disponível para a produção de polifosfato depende da taxa de absorção de fosfato através da parede celular e do uso subsequente de fósforo para o crescimento (POWELL et al., 2009). Na Figura 1 está apresentado o mecanismo de assimilação de fósforo total e nitrogênio amoniacal, este segundo, através das enzimas GDH e GS e pelas microalgas.

Figura 1. Mecanismos de assimilação de nitrogênio amoniacal e fósforo total pelas microalgas.



Fonte: Autora (2020)

As microalgas verdes *Scenedesmus sp.* e *Chlorella sp.* são destacadas pela eficiência em absorção de fósforo no ambiente natural, tendo sido desenvolvidos trabalhos que indicam a remoção efetiva de P das águas residuárias em uma variedade de configurações (AZAD & BORCHARDT, 1970). Por exemplo, níveis elevados (até 90%) de remoção de P foram alcançados pela imobilização destas microalgas em substrato sintético, folhas ou como esferas (WEI et al., 2008). Sukacova et al. (2015) alcançaram taxas de remoção de P de até 98% usando um fotobiorreator de biofilme tratando águas residuárias. Em contraste, Kesaano et al. (2015) relataram taxas de remoção de P de apenas 41% de um biofilme de algas cultivadas, embora a remoção de N tenha sido de até 100%, sugerindo que o N pode ter sido limitante em seus sistemas.

Diante do exposto, é imperativo a aplicação da fitorremediação como ferramenta biotecnológica no tratamento dos lixiviados com a finalidade de evitar o comprometimento da qualidade ambiental, a exemplo do enriquecimentos dos corpos aquáticos e da saúde pública.

1.2. Imobilização celular

A imobilização consiste na retenção de células ou enzimas em uma estrutura física insolúvel, que as obriga a permanecerem em uma região particular do biorreator. Este processo, quando realizado por microrganismos forma biofilmes, flocos e pellets, considerado assim um fenômeno comum na natureza (PRADELLA, 2001).

O uso de microalgas imobilizadas tem sido investigado em vários segmentos, a exemplo do farmacológico, nutricional e no tratamento de águas residuárias. O confinando de microalgas vivas dentro de um gel que é moldado em contas, supera muitas das barreiras dos sistemas abertos, como o da saída da biomassa dos biorreatores (MALLICK, 2002). Esses géis são hidrofílicos com pequenos poros para permitir a difusão de águas residuais para as células de microalgas aprisionadas. A imobilização promove maior afinidade do microrganismo pelo substrato e maior tolerância às altas concentrações de compostos tóxicos ao crescimento microbiano, uma vez que a matriz de imobilização resulta, geralmente, na maior proteção das células (COVIZZI et al., 2007).

Essa tecnologia apresenta diversas vantagens operacionais:

(I) proporciona estabilidade o design do sistema fotobiorreator (II) melhora a estabilidade operacional (III) favorece a regeneração das microalgas imobilizadas (IV) evita o esgotamento celular (V) facilita a cultivo de microalgas e fácil colheita de biomassa (VI) alta e rápida absorção de nutrientes com curto TDH (VII) permite bioprocessos com melhor iluminação, eficiência de utilização por área e maiores densidades celulares (VIII) concentrações de metabólitos (IX) alta tolerância contra ambientes adversos como pH, temperatura, radiação ultravioleta e compostos tóxicos (X) protegem culturas envelhecidas contra os efeitos nocivos da fotoinibição (XI) protegem as microalgas da predação pelo zooplâncton selvagem (XII) aumenta a capacidade de bioadsorção e bioatividade da biomassa; e (XIII) permite a imobilização de mais de um microrganismo (EROGLU et al., 2015; VASILIEVA et al., 2016).

Os materiais imobilizantes possuem propriedades geralmente hidrofílicas favorecendo maior difusão de águas residuárias nas esferas. Polímeros naturais como alginato, carragenina e quitosana são os mais comuns materiais imobilizadores usados no tratamento de águas residuárias (SHI et al., 2007; MORENO-GARRIDO, 2008; EROGLU et al., 2015). Sendo isto devido às seguintes vantagens: (i) não-tóxicos, econômicos e de fácil processamento; (ii) transparência e permeabilidade; (iii) elevada taxa de difusão de nutrientes; (iv) produtos ambientalmente sustentáveis, pois produzem menos resíduos perigosos após o tratamento; e (v) são biocompatíveis (EMPARAN et al., 2018).

Segundo Eroglu et al. (2015), o efeito duplo da taxa fotossintética aumentada e da troca iônica entre os íons nutrientes e a matriz imobilizada resulta na remoção eficiente de nutrientes das águas residuárias. Géis aniônicos (como carragenina e alginato) adsorvem cátions (por exemplo, NH_4^+) e ânions (PO_4^{3-} , NO_3^- , NO_2^-) com alta eficiência.

São descritos a seguir, seis grupos de métodos de imobilização: adsorção, floculação, ligação covalente, ligação cruzada, aprisionamento em membranas semipermeáveis e aprisionamento em gel.

1.2.1. 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. Nesse sentido, 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).

Akhtar et al. (2004) utilizaram biomassa de *Luffa cylindrica* para imobilizar células de *Chlorella sorokiniana* e remover o níquel (II) de soluções aquosas. Este sistema imobilizado demonstrou acumular 25% mais de níquel do que células livres após a exposição de 20 minutos. Huang et al. (2003), imobilizou *Chlorella pyrenoidosa* em sulfato de acetato de polivinilo (PVA) para a remoção de nitrato e fosfato, os resultados indicaram que as microalgas se reproduziram rapidamente dentro de um suporte de gel de PVA sob pH variando de 5 a 10.

1.2.2. Floculação

No processo de floculação ocorre a agregação de células entre si, este, pode ocorrer naturalmente ou ser artificialmente induzido com a adição de agentes floculantes. A quitosana é o agente floculante mais amplamente empregado, obtido a partir da quitina do exoesqueleto de artrópodes. Consiste de um amino polissacarídeo biodegradável formado por unidades de b-D-glucosamina (2-amino-2-desoxi-b-D-glucano) unidas por ligações (1, 4) (OUNGBHO & MULLER, 1997). Os grupamentos amino conferem carga positiva, promovendo a capacidade de adsorver partículas carregadas negativamente.

A prática da floculação tem sido utilizada principalmente na indústria de bebidas, uma vez que a floculação 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. (MORENO GARRIDO, 2008).

1.2.3. Ligação covalente

Ligação covalente é uma técnica utilizada para a imobilização de enzimas, nesse método, suportes são funcionalizados para conter um grupamento químico responsável pela imobilização do biocatalisador. Os grupos funcionais mais investigados são 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 (VILLENUEVE et al., 2000).

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, pois a desvantagem deste método é a necessidade de condições severas de reação, a exemplo das altas temperaturas (FABER, 1995). A principal vantagem dessa técnica é evitar a dessorção da enzima, além disso as enzimas obtidas imobilizadas são geralmente muito estáveis e resistentes à condições extremas de pH e temperatura. Contudo, pode-se verificar uma perda de atividade inicial do biocatalisador, uma vez que a estrutura tridimensional da enzima é consideravelmente modificada após ligação ao suporte (VILLENUEVE et al., 2000).

1.2.4. Ligação cruzada

Na ligação cruzada envolve a união covalente de enzimas são ligadas umas as outras através de ligações covalentes, obtendo-se estrutura tridimensional complexa e insolúvel de alta massa molecular (BICKERSTAFF, 1997). 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 disocianato de hexametileno. As ligações são estabelecidas entre os grupamentos amina, sulfidril e hidroxila. Os efeitos difusionais são importantes, já que boa parte da enzima está localizada no interior de uma complexa estrutura que impede o acesso ao substrato (FABER, 1995).

1.2.5. 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).

O sistema mais difundido para o aprisionamento de enzimas numa rede polimérica é o gel poliacrilamida é realizada na presença da enzima. Contudo, o suporte age como uma barreira à transferência de massa (BICKERSTAFF, 1997).

1.2.6. Aprisionamento em gel

A técnica, aprisionamento em gel, 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 et al., 2001).

O gel polissacarídeo mais comumente usado em imobilização celular 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. As microalgas são imobilizadas em vários polímeros para diferentes fins biotecnológicos, como estudos de morfologia, produção de substâncias químicas finas, produção de energia e tratamento de águas residuárias (MORENO-GARRIDO, 2008).

O principal mecanismo de imobilização, por aprisionamento em matriz polimérica, consiste na mistura de células microbianas com um composto polimérico com cargas negativas (alginato, pectato). A formação das esferas de alginato de cálcio ocorre através de uma reação denominada geleificação iônica. Para tanto, uma suspensão de células microbianas em solução de alginato de sódio é gotejada em uma solução iônica de concentração adequada, geralmente CaCl_2 para a formação do gel de diferente porosidade (CULPI et al., 2010). A ligação dos íons Ca^{2+} aos resíduos de guluronato resulta na formação de esferas de gel de alginato consistentes e insolúveis. As características dos biocatalizadores imobilizados formados dependerão da velocidade de fluxo, densidade da solução de polímero e concentração da solução iônica na qual o gel será formado (WANG et al., 2005).

Em sistemas de imobilização polimérica, semelhante a outros sistemas de biofiltração, há separação física entre os microrganismos e as águas residuárias tratadas. Os microrganismos são imobilizados vivos dentro do polímero, pois seus poros são menores do que os microrganismos, enquanto o fluido se desloca através da matriz e sustenta seu metabolismo e eventual crescimento. A imobilização em polímeros é especificamente importante no tratamento de águas residuárias, pois, soluciona o problema inerente da biomassa produzida por microalgas suspensas nas águas residuárias (VALDERRAMA et al., 2002).

Em estudo realizado por ANISHA & PREMA (2008) foram imobilizadas células de *Streptomyces griseoloalbus* em esferas de alginato de cálcio, conseguindo aumentar a produtividade da enzima galactosidase em comparação com o 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.

À luz de Singh (2003), as microalgas imobilizadas apresentaram expressivas melhorias em seu metabolismo e fisiologia. A imobilização, em esferas de alginato das microalgas ricas em hidrocarbonetos, *Botryococcus braunii* e *Botryococcus protuberans*, produziu um aumento significativo na clorofila, carotenóides, peso seco e lipídios durante as fases de crescimento estacionário e em repouso, comparando às células vivas livres. A fotossíntese em ambas as espécies foi melhorada, em relação às células livres com senescência retardada.

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 microesferas do gel de carragenan é estimada na faixa de 0,08 a 0,1mm³, enquanto que em géis de alginato, estes valores são um pouco maiores, entre 0,1 a 0,16 mm³ (OGBONNA et al., 2001). 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. O crescimento celular nestes tipos de imobilização depende da limitação imposta pela porosidade do material e do acúmulo de biomassa no interior da matriz. São vários os géis utilizados como: ágar, agarose, goma carragenana, alginato e quitosana, além de géis como o álcool polivinílico (PARASCANDOLA et al., 2006).

Em estudo de Filippino et al. (2015) foi demonstrado o desempenho de microalgas imobilizadas para um sistema contínuo de tratamento de PO₄³⁻ com um máximo concentração entre 0,4 e 1,8 mg. L⁻¹, com uma remediação de 60 a 100% em TDH de 12 horas sob diferentes condições de iluminação e adição de CO₂. No Quadro 1, são apresentados resultados de alguns estudos de remoção de nutrientes utilizando sistemas de algas imobilizadas.

Quadro 1- Estudos de remoção de nitrogênio e fósforo utilizando a microalga *Chlorella* imobilizada.

| Matriz Imobilizante | Espécie Algal | Poluente Alvo | Referência |
|-----------------------------|--|----------------------------|--------------------------|
| Esferas de Carragena | <i>Chlorella vulgaris</i> ; cianobactéria <i>Anabaena doliolum</i> | Fosfato, Nitrato e Nitrito | Mallick & Rai (1994) |
| Esferas de Alginato | <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Chlorella kessleri</i> , <i>Scenedesmus quadricauda</i> | Amônio e Fosfato | Travieso et al.(1996) |
| Esferas de alginato | <i>Chlorella vulgaris</i> | Amônio, Fosfato | Tam e Wong (2000) |
| Esferas de alginato | <i>Chlorella vulgaris</i> ; cianobactéria <i>Anabaena doliolum</i> | Amônio, Fosfato | de-Bashan et al. (2002b) |
| Esferas de alginato | <i>Chlorella sorokiniana</i> e <i>A. brasilense</i> (co-imobilizados) | Fosfato | Hernandez et al., (2006) |
| Esferas de Alginato | <i>Chlorella</i> sp. | P-Total, Ortofosfato | Silva et al. 2019 |
| Esferas de Alginato | <i>Chlorella</i> sp. | Amônio | Silva et al. 2019 |

Fonte: modificado de Eroglu et al. 2015; Silva et al. 2019(a); Silva et al. 2019(b).

Tam & Wong (2000) imobilizaram *Chlorella vulgaris* em matriz de alginato de cálcio para a remoção de N e P de efluente doméstico sintético. Foram obtidas remoções completas de NH_4^+ e cerca de 95% de PO_4^{3-} operando biorreatores em TDH de 24 h, com relação ideal de 12 esferas para cada 3 mL de substrato à ser tratado.

Em estudo desenvolvido por De-Bashan et al., (2002) aplicando a *Chlorella vulgaris* co-imobilizada com a bactéria *Azospirillum brasilense* em alginato de cálcio, visando a remoção de íon amônio e ortofosfato de efluente sintético. As remoções registradas nas esferas com a microalga em participação com a bactéria foram significativamente maiores em comparação com as esferas que continham apenas a *Chlorella vulgaris*.

Hernandez et al. (2006) estudaram a *Chlorella sorokiniana* e *Chlorella vulgaris* co-imobilizadas com *Azospirillum brasilense* para a remoção de fósforo total de águas residuárias domésticas. Foram obtidas remoções de até 72% de fósforo total após pré- privação de nutrientes para a cultura. Foram registradas melhores remoções em cargas mais elevadas e culturas co-imobilizadas em comparação às algas immobilizadas sem a bactéria.

Silva et al. (2019), isolaram cepas de *Chlorella* sp. de uma série de 04 reatores de fluxo horizontal abertos, que tratavam lixiviado de aterro sanitário com alta concentração nitrogênio amoniacal diluído em esgoto sanitário. A microalga foi immobilizada em matriz de alginato de cálcio. Foram monitorados biorreatores tubulares com volumes de 0,1 e 1,0 L alimentados com efluente advindo de um filtro aeróbio na remoção de ortofosfato e P-Total. Nos biorreatores de 1L recheados com aproximadamente $1,2619 \times 10^4$ esferas em concentração afluente de fósforo total de $6,3 \text{ mg.L}^{-1}$, tendo sido registrada remoção média de 81% em TDH de 3h. Nos biorreatores de 0,1L foram registradas ao final de um perfil de 5 h, eficiência média de remoção em torno de 87% para ortofosfato e 79,6% para P- Total.

1.2.6.1. Alginato e quitosana como matrizes imobilizantes

O alginato é um copolímero linear pertencente a um grupo de polissacarídeos comumente extraído da parede celular de algas marinhas marrons (MACKIE et al., 2016). Sua estrutura química estará visualizada na Figura 3, compondo cerca de 40% da massa seca de várias espécies de algas marinhas (*Phaeophyta*), o alginato promove flexibilidade e rigidez à parede celular. Extraem-se anualmente, 30 mil toneladas de alginato das algas marinhas, valor que representa menos de 10% do material naturalmente biossintetizado por elas (GARCIA-CRUZ et al., 2008).

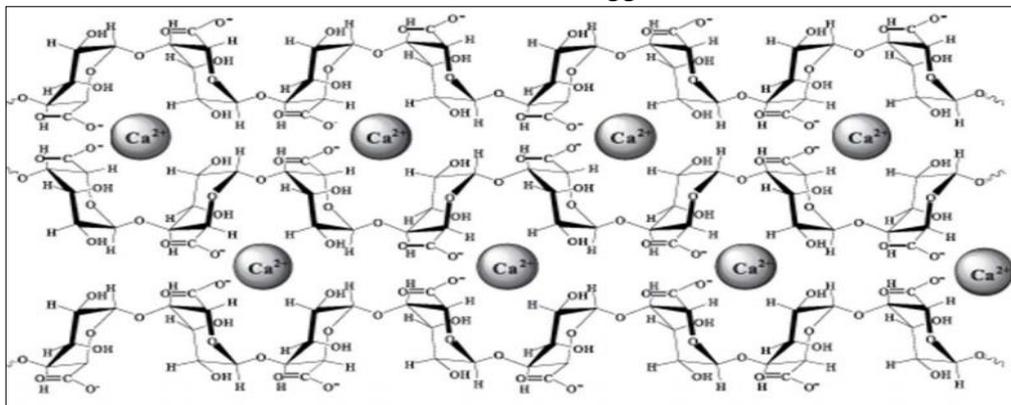
O alginato é considerado um polissacarídeo natural biocompatível e biodegradável utilizado na imobilização de proteínas e células, devido às suas vantagens significativas, como a boa biocompatibilidade, baixo custo, fácil disponibilidade e simplicidade de preparação (LU et al., 2005, ZHOU et al., 2010).

Ainda, o alginato é constituído de sais de ácidos algínicos, sendo estes, o ácido manurônico (M) e o ácido gulurônico (G). Esses ácidos se ligam, formando blocos homopoliméricos M-M e G-G ou heteropoliméricos M-G. Esta ligação ocorre de acordo com a posição mais favorável energeticamente. A proporção dos blocos é dependente da espécie de

alga marinha da qual se extrai o alginato. O comprimento e o número de blocos determinam as propriedades físicas do material extraído (GARCIA-CRUZ et al., 2008).

Nesse universo, o alginato de sódio é um composto amplamente utilizado em diversos setores por ser solúvel em água e tornar-se insolúvel na presença de cátions bivalentes (Ca^{++} ou Mg^{++} , por exemplo). Esses cátions se ligam entre os blocos homopoliméricos lineares conforme está apresentado na Figura 2, formando uma estrutura conhecida por egg-box model (modelo caixa de ovo), formando, assim, uma estrutura tridimensional gelatinosa, unida por íons de cálcio ou magnésio (SOUZA et al., 2008).

Figura 2. Representação da ligação dos blocos de homopolímeros através de Íons de cálcio, formando o egg-box model



Fonte: adaptado de Kawaguti e Sato (2009)

O alginato apresenta propriedades únicas que o tornam um produto de grande importância comercial pela sua capacidade de geleificar e espessar soluções, assim como no seu potencial biotecnológico como suporte para a imobilização de enzimas e células. O uso de gel de alginato na imobilização celular é muito versátil e apresenta diferentes aplicações, possibilitando o uso de células vivas ou inativadas em biorreatores possibilitando aplicações inovadoras em diferentes áreas de conhecimento (MÜLLER et al., 2011).

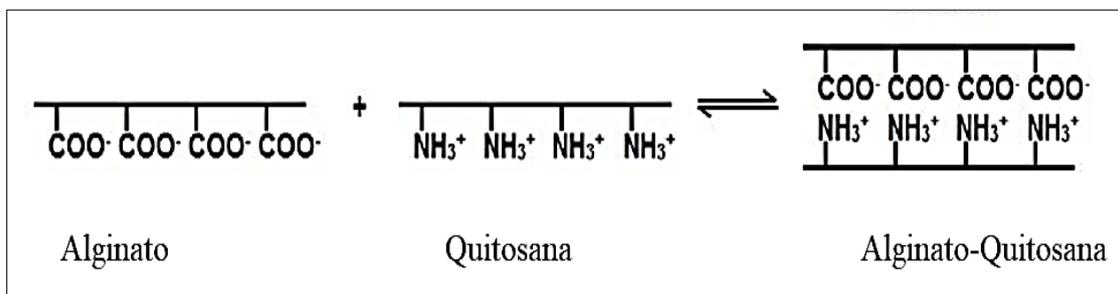
Um fator a ser considerado é que o gel de alginato limita a transferência de oxigênio no interior do gel, o que pode ser vantagem ou desvantagem, dependendo do tipo de biocatalisador retido (ZAIN et al., 2011). Uma das principais causas do rompimento das esferas de alginato é a ação de agentes quelantes, sendo este um problema simples de ser minimizado com a adição de mais íons de cálcio (Ca^{2+}) no meio (KAWAGUTI e SATO, 2009).

Quitosana é um produto obtido da quitina, extraído e isolado de exoesqueleto de crustáceos como lagostas, camarões e caranguejos. É também considerado um polissacarídeo biocompatível, biodegradável e não tóxico. Estudos mostraram que a formação de

microcápsulas de alginato-quitosana exibiram uma melhor biocompatibilidade e resistência mecânica (WANG et al., 2006). Este carboidrato é insolúvel em água, mas que pode ser solubilizado em ácido acético diluído através de formação do seu acetato (THANOO et al., 1992). Quimicamente é o β (1 \rightarrow 4) -2-amino-2-desoxi-D-glicose, obtido pela hidrólise dos grupos aminoacetil da quitina, um polissacarídeo abundante, componente estrutural das carapaças protetoras de crustáceos (KAS, 1997).

A quitosana, considerada um polímero catiônico que interage com o alginato, sendo este, um polissacarídeo linear aniônico, os dois polímeros formam uma matriz tridimensional através da interação iônica entre grupos amino protonados da quitosana e porções de carboxilato de alginato (YU et al., 2011; ZHOU et al., 2010) para preparação de um polímero composto. Na Figura 3 está apresentada a ligação entre a carboxila do alginato e a amina da quitosana, formando o complexo alginato-quitosana.

Figura 3. Ligação entre alginato e quitosana para formar o complexo alginato-quitosana.



Fonte: WANG, (2006)

A aplicação biotecnológica dos polímeros na imobilização de microalgas visando a recuperação de recursos presentes em águas residuárias, apresenta-se como uma ampla janela de possibilidades principalmente no que concerne à melhor compreensão da fisiologia da célula e a mitigação da problemática da eutrofização dos corpos aquáticos.

REFERÊNCIAS

ABRELPE (Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais) - **Panorama dos Resíduos Sólidos do Brasil**. 2018-2019. Disponível em: <http://abrelpe.org.br/download-panorama-2018-2019>, Acesso em: 13 de janeiro de 2020.

AITCHISON, P.A.; BUTT, V.S. The relation between the synthesis of inorganic polyphosphate and phosphate uptake by *Chlorella vulgaris*, **Journal of Experimental Botany**, v. 24, p. 497–510. 1973.

AKHTAR, N.; IQBAL, J.; IQBAL, M. Enhancement of lead (II) biosorption by microalgal biomass immobilized onto loofa (*Luffa cylindrica*) sponge. **Eng. Life Sci.** , v. 4, p. 171–178, 2004b.

AL-KHATIB, I. A.; MONOU, M.; ZAHRA, F. A. A. S.; SHAHEEN, H. Q.; KASSINOS, D. Solid waste characterization, quantification and management practices in developing countries. A case study: Nablus district – Palestine, **Journal of Environmental Management**, p. 1-8, 2010.

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

AZAD, H. S & BORCHARDT, J. A. Variations in phosphorus uptake by algae. **Environ. Sci. Technol.**, v.4, p. 737–743, 1970.

AZIZ, S.Q.; AZIZ, H.A.; YUSOFF, M.S.; BASHIR, M.J.K. Leachate characterization in semi-aerobic and anaerobic sanitary landfills: a comparative study. **Journal of Environmental Management**.v.91, p.26082614, 2010.

BICKERSTAFF, G, F. Immobilization of enzymes and cells. In: SCHMAUDER, H, P (Ed). *Methods in biotechnology*. Totowa: **Humana Press**. v.1, p 1-11, 1997.

BILA, D. M. Aplicação de Processos Combinados no Tratamento do Chorume. Rio de Janeiro, XIV, 95p - Dissertação de Mestrado - **Universidade Federal do Rio de Janeiro**.2000.

BRASIL. Lei nº 12.305 de 2 de agosto de 2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos, altera a Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998 e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2 de ago. de 2010.

BROWN, & SHILTON, A. Luxury uptake of phosphorus by microalgae in waste stabilization ponds: current understanding and future direction. **Rev. Environ Sci. Biotechnol.**,v. 13, p. 321-321, 2014.

CAI, T., PARK, S. Y., & LI, Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.19, p.360–369, 2013.

CASTILHOS JUNIOR, A. B.; DALSASSO, R. L.; ROHERS, F. Pré- tratamento de lixiviados de aterros sanitários por filtração direta ascendente e coluna de carvão ativado. **Eng. Sanit. Ambient.**, v.15, n.4. p. 385-392, 2010.

CEMBELLA, A.D.; ANTIA, N.J.; HARRISON, P.J. The utilization of inorganic and organic phosphorous compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: a multidisciplinary perspective: part 2. **CRC Critical Reviews in Microbiology**, v.11, p.13–81, 1984.

- CETESB - **Companhia Ambiental do Estado de São Paulo**. Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/Institucional/glossario/glossario_a.asp. Acesso em: 13 de jan. de 2020.
- CHENG H-X; TIAN G-M. Preliminary evaluation of a newly isolated microalgae *Scenedesmus* sp. CHX1 for Treating Landfill Leachate. **Intell Syst Des Eng Appl.**, 2013.
- CHOPIN, T.; LEHMAL, H.; HALCROW, K. Polyphosphates in the red macroalga *Chondrus crispus* (Rhodophyceae). **New Phytologist**, v.135, p.587–594, 1997.
- CHU, C.R.; SOONG, C.K. Numerical simulation of wind-induced entrainment in a stably stratified water basin. **Journal of Hydraulic Research**, v. 35, p. 21-41, 1997.
- COLLOS, Y.; HARRISON, P.J. Acclimation and toxicity of high ammonium concentrations to unicellular algae, **Elsevier. Marine Pollution Bulletin.** , v.80, p.8-23, 2014.
- CONTRERA, R. C. Tratamento de lixiviados de aterros sanitários em sistema de reatores anaeróbio e aeróbio operados em batelada sequencial. Tese de Doutorado – Escola de Engenharia de São Carlos, **Universidade de São Paulo**, 2008.
- COVIZZI, L. G.; GIESE, E. C.; GOMES, E.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, R. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 28, p. 143-160, 2007.
- CULPI, T. A.; PASQUALIM, P.; FIN, M. T.; SASSO, D. G. B.; KAMINSKI, G. A. T.; FUJIWARA, G. M.; NUNES, P. M. P.; RODRIGUES, B. H.; DIAS, J. F. G.; ZANIN, S. M. W. Importância de parâmetros de controle na elaboração de micropartículas de Ca²⁺ - alginato. **Visão Acadêmica**, v. 11, p. 38-44, 2010.
- 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 Resourch.** , v. 36, p. 2941-2948, 2002.
- ELSER, J. J. Phosphorus: a limiting nutrient for humanity. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 933-938, 2012.
- EMPARAN, Q.; HARUN, R.; DANQUAH, M.K. Role of phycoremediation for nutrient removal from wastewater: a review. **Applied Ecology and Environmental Research.** v.17, p.889-915. 2018.
- EROGLU, E; SMITH, S, M; RASTON, C, L. Application of various immobilization techniques for algal bioprocesses In: biomass and biofuels from microalgae. **Advances in Engineering and Biology. Springer**, p. 3-9, 2015.
- FABER, K. Special echniques: mmobilization. In: _____. biotransformations in organic chemistry: **A Textbook. 2 ed. Berlin: Springer-Verlag**, p. 312-322, 1995.

- FARIAS, D.S, Tratamento conjugado de águas residuárias e lixiviado de aterro sanitário em lagoas de estabilização rasas. Dissertação de Mestrado. 96p. **UEPB**, Campina Grande- PB, 2010.
- FILIPPINO, K, C.; MULHOLLAND, M, R & BOTT, C, B. Phycoremediation strategies for rapid tertiary nutrient removal in waste stream. **Algal Research**, v. 11 p.125-133, 2015.
- FU, F & WANG Q. “Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. ” **Journal of Environmental Management**, v. 92, p. 407-418, 2011.
- GARCIA-CRUZ, C.H; FOGETTI, U; SILVA, A, N. Alginato bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção. **Quimica Nova**, v. 31, n. 7, p. 1800-1806, 2008.
- GIORDANO, M.; NORICI, A.; FORSSEN, M.; ERIKSSON, M.; RAVEN, J.A. An anaplerotic role for mitochondrial carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Physiol.** , v.132, p. 2126–2134, 2003.
- GOLDMAN J, C. Physiological aspects in algal mass cultures. In: Shelef G, Soeder CJ (eds) Algae biomass, production and use. **Elsevier**, Amsterdam,1980.
- GOVIND, P, & MADHURI, S. “Heavy metals causing toxicity in animals and fishes.” **Research journal of animal, veterinary and fishery sciences**, v. 2, p. 17-23, 2004.
- HE, S & XUE, G. Algal-based immobilization process to treat the effluent from a secondary wastewater treatment plant (WWTP). **Journal Hazard Mater.**, v. 178, p. 895–899, 2010.
- HELLEBUST, J.A & AHMAD, I. Regulation of nitrogen assimilation in green microalgae, **Journal Biological Oceanography**, v. 6, p.241-255, 2013.
- HEMENS J, MASON M. H. Sewage nutrient removal by a shallow algal stream. **Water Research**, v.2, p.277–287, 1968.
- HERNANDEZ, J.P.; DE-BASHAN, L, E.; BASHAN, Y. Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga *Chlorella* spp. co-immobilized with *Azospirillum brasilense*. **Enzyme and Microbial Technology**. v.38, p. 190-198. 2006.
- HETKA, C. C. I.; SOUZA, B. J.; VIDAL, M. C.; SOUSA, V. K. Tratamento de lixiviado de aterro sanitário por coagulação, ultrafiltração e processo oxidativo avançado. **Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales**, v. 9, n. 2, p. 240 – 255, 2016.
- HU, W. H.; SONG, X. S.; SHI, K.; XIA, X. J.; ZHOU, Y. H.; YU, J. Q. Changes in electron transport, superoxide dismutase and ascorbate peroxidase isoenzymes in chloroplasts and mitochondria of cucumber leaves as influenced by chilling. **Photosynthetica**, v.46, p.581-588, 2008.
- HUANG, G.L.; WANG, Y. Nitrate and phosphate removal by co-immobilized *Chlorella pyrenoidosa* and activated sludge at different pH values. **Water Qual. Res. J. Can.** , v. 38, p. 541–551, 2003.

INOKUCHI, R., OKADA, M. Physiological adaptations of glutamate dehydrogenase isosyme activities and other nitrogen-assimilation enzymes in the microalgae *Bryopsis maxima*. **Plant Science**, v. 161, p. 35-43. 2001.

JIA H.; YUAN Q. Removal of nitrogen from wastewater using microalgae and microalgae-bacteria consortia. **Cogent Environ Science**, v. 2 p.1–15, 2016.

KAPLAN, D.; RICHMOND A. E.; DUBINSKY Z.; AARONSON S. Algal nutrition. In: Richmond AE (ed) CRC handbook of microalgal mass culture. **CRC Press, Boca Raton**, 1986.

KAWAGUTI, H. Y.; SATO, H. H. Isomaltulose production, a new sucrose substitute, using microbial glucosyl transferase. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p.134-143, 2009.

KESAANO, M.; GARDNER, R. D.; MOLL, K.; LAUCHNOR, E.; GERLACH, R.; PEYTON, B. M., Dissolved inorganic carbon enhanced growth, nutrient uptake, and lipid accumulation in wastewater grown microalgal biofilms, **Bioresource Technology**, v. 180, p. 7–15, 2015.

KHAN, M. N & MOHAMMAD, F. “Eutrophication: challenges and solutions.” In eutrophication: causes, consequences and control, dordrecht: **Springer Science**, v. 2 2014.

KIRK, M, M & K, L, KIRK. Carrier-mediated uptake of originine and urea by *Volvox carteri f. nagariensis*. **Plant Physiol.**, v. 61, p.451-458, 1978a.

KJELDEN, P.; CHRISTENSEN, T, H. A simple model for the distribution and fate of organic chemicals in a landfill: MOCLA. **Waste Management & Research**, v. 19, p. 201-216, 2001.

KJELDSEN, P.; BARLAZ, M, A.; ROOKER, A, P.; BAUN, A.; LEDIN, A.; CHRISTENSEN, T, H. Present and long-term composition of MSW landfill leachate: a review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 32, p. 297-336, 2002.

KLOCHENKO, P.D.; GRUBINKO, V,V.; GUMENYUK, G,B.; ARSAN, O,M. Peculiarities of ammonium nitrogen assimilation in green and blue-green algae. **Hydrobiology Journal**, v. 39, p. 102–108, 2003.

KUHL A. Phosphorus. In: Stewart WDP (ed) Algal physiology and biochemistry. Blackwell Scientific, **Oxford**, 1974.

LAK, M.G.; SABOUR, M.R.; AMIRI, A.; RABBANI, O. Application of quadratic regression model for Fenton treatment of municipal landfill leachate. **Waste Management**, v.32, p. 1895-1902, 2012.

LANGE L, C.; ALVES J,F.; AMARAL M, C, S. e MELO W.R. Tratamento de lixiviado de aterro sanitário por processo oxidativo avançado empregando reagente de Fenton. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 2, p. 175-183, 2006.

- LARSDOTTER, K. Wastewater treatment with microalgae—a literature review. **Vatten**, v. 62, p. 31–38, 2006.
- LEITE, V. D.; SILVA, S. A.; LOPES, W. S.; SOUSA, J. T.; PRASAD, S. Resíduos sólidos urbanos no estado da Paraíba: aspectos conjunturais. In: **SIMPÓSIO NORDESTINO DE SANEAMENTO AMBIENTAL**, 1. Seção Paraíba. João Pessoa, 2006.
- 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, p. 187-192, 2002.
- LU, Y; XU, S; JIANG, Z; YUAN, W; WANG, T. Diffusion of nicotinamide adenine dinucleotide in calcium alginate hydrogel beads doped with carbon and silica nanotubes. **Journal. Chem. Eng. Data**. v. 50, p. 1319-1323, 2005.
- MAJED, N.; LI, Y.; GU, A. Z. Advances in techniques for phosphorus analysis in biological sources. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 1-8, 2012.
- MARONEZI, M, M; ZEPKA, L, K; VIEIRA, J, G; QUEIROZ, M, I; JACOB- LOPES, E. A tecnologia de remoção de fósforo: gerenciamento do elemento em resíduos industriais. Ambiente e Água - **An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 9, p. 445-458, 2014.
- MIYACHI, S.; KANAI, R.; MIHARA, S.; AOKI, S. Metabolic roles of inorganic polyphosphates in *Chlorella* cells. **Biochim Biophys Acta** v. 93, p. 625–634, 1964.
- MORAWE, B.; RAMTEKE, D.; VOGELPOHOL, A. Activated carbon column performance studies of biologically treated landfill leachate. **Chemical Engineerin and processing**, v. 34, p. 299 -303, 1995.
- MORENO-GARRIDO, I. Microalgae immobilization: Current techniques and uses. **Bioresource Technology**, v. 99, p.3949–3964, 2008.
- MÜLLER, J. M.; SANTOS, R. L.; BRIGIDO, R. V. Produção de alginato por micro-organismos. **Polímeros**, vol. 21, n. 4, p. 305-310, 2011.
- NAGARAJAN, R, THIRUMALAISAMY, S, LAKSHUMANAN, E. Impact of leachate on groundwater pollution due to non-engineered municipal solid waste landfill sites of erode city, Tamil Nadu, India. **Iranian J Environ Health Sci Eng.**, p.9-35, 2012.
- NAGASOE, S.; SHIKATA, T.; YAMASAKI, Y.; MATSUBARA, T.; SHIMASAKI, Y.; OSHIMA, Y.; HONJO, T. Effects of nutrients on growth of the red-tide dinoflagellate *Gyrodinium instriatum* freudenthal et lee and a possible link to blooms of this species. **Hydrobiology**. v. 651, p. 225–238, 2010.
- NAKAMURA, C. Y. Estudo de um sistema de lagoas de estabilização no tratamento do lixiviado e da água subterrânea no entorno de aterros sanitários em Minas Gerais. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia Civil) **Universidade Federal de Viçosa**, 145p, 2012.

- OGBONNA, J. C.; MASHIMA, H.; TANAKA, H. Scale up of fuel ethanol production from sugar beet juice using loofa sponge immobilized bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 76, n. 1, p. 1-8, 2001.
- OSADA T.; NEMOTO K.; NAKANISHI H.; HATANO A.; SHOJI R.; NARUOKA T, Analysis of ammonia toxicity in landfill leachates. **Int Sch Res Netw ISRN Toxicol**, p. 1-6, 2011.
- OULEGO, P.; COLLADO, S.; LACA, A.; DIAZ, M. Impact of leachate composition on the advanced oxidation treatment. **Water Research**, n^o 8, p. 389-402, 2016.
- OUNGBHO, K.; MULLER, B.W., Chitosan sponges as sustain release drug carriers. **Int. Journal. Pharm.** v. 156, p. 229–237, 1997.
- PARASCANDOLA, P.; BRANDUARDI, P.; ALTERIS, E. D. PVA-gel (Lentikats®) as an effective matrix for yeast strain immobilization aimed at heterologous protein production. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 38, n^o 5, p. 184-189, 2006.
- PENG Y. Perspectives on technology for landfill leachate treatment. **Arab. Journal. Chem.**, 2013.
- PERTILE, C. Avaliação de Processos de Separação por Membranas como Alternativas no Tratamento de Lixiviado de Aterro Sanitário. Porto Alegre, RS: UFRS, 127p. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química), **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2013.
- POWELL, N.; SHILTON, A.; CHISTI, Y.; PRATT, S. Towards a luxury uptake process via microalgae - Defining the polyphosphate dynamics. **Water Research**. v. 43, p. 4207–4213, 2009.
- 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**, v. 2, p. 355-372, 2001.
- PROVASOLI, L. Nutrition and ecology of protozoa and algae. **Ann. Rev. Microbiol.** , v. 12, p. 279–308, 1958.
- RENOU, S., GIVAUDAN, J. G., POULAIN, S., DIRASSOUYAN, F., & MOULIN, P. Landfill leachate treatment: Review and opportunity. **Journal of Hazardous Materials**, v.150, p. 468-493, 2008.
- RICHMOND, A., *Handbook of Microalgae Mass Culture*, Boston: **CRC Press**, p. 156-177, 1990.
- SAUER, N. A general amino acid permease is inducible in *Chlorella vulgaris*. **Planta**, v. 161, p. 425-431, 1984.
- SAUER, N.; E. KOMOR.; W. TANNER. Regulation and characterization of two inducible amino acid transport systems in *Chlorella vulgaris*. **Planta** 159:404-410, 1983.

SAWYER, N.A.; CHAMBERS, S.M.; CAIRNEY, J.W.G. Utilization of inorganic and organic phosphorus sources by isolates of *Amanita muscaria* and *Amanita species native* to temperate eastern Australia. **Australian Journal of Botany**, v.51, p.151-158, 2003.

SHI, J.; PODOLA, B.; MELKONIAN, M. Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae immobilized on twin layers: an experimental study. **J. Appl. Phycol.**, v. 19, p. 417–423, 2007.

SILVA, M.C.C.P.; SOUSA, J.T.; PEARSON, H.W.; ALBUQUERQUE, M.V.C.; GOMES, L.S.; LEITE, V.D. Estabilidade do alginato de cálcio como matriz imobilizante da *Chlorella* sp. no tratamento de efluente secundário- As Regiões Semiáridas e suas Especificidades 2- **Editora Atena**, p. 165-174, 2019.

SILVA, M.C.C.P, CARTAXO, A.S.B, SOUSA, A.R, PEARSON, H.W, LEITE, V.D. "Remoção de nitrogênio amoniacal de lixiviado de aterro sanitário aplicando *Chlorella* sp. em biorreator alimentado em fluxo contínuo". Anais I CONIMAS e III CONIDIS. **Realize Editora**, 2019. Disponível em: <<https://editorarealize.com.br/artigo/visualizar/63863>>. Acesso em: 26/10/2020.

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

SINGH, D.; NEDBAL, L; EBENHÖH, O. Modelling phosphorus uptake in microalgae. **Biochemical Society Transactions**, v. 46, p. 483-490, 2018.

SOUZA, K. V.; PERALTA-ZAMORA, P.; ZAWADZKI, S. F. Immobilization of iron (II) in alginate matrix and its use in textile dye degradation by Fenton processes. **Química Nova**, v. 31, n^o 5, 2008.

SUKACOVA, K.; TRTÍLEK, M.; RATAJ, T. Phosphorus removal using a microalgal biofilm in a new biofilm photobioreactor for tertiary wastewater treatment. **Water Research.**, v. 71, p. 55–63, 2015.

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

TELLES, C. A. S, Processos combinados para o tratamento de lixiviado de aterro sanitário. Tese (Doutorado em Engenharia Química). **Universidade Federal do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em:<http://fenix3.ufrj.br/60/teses/coppe_m/ClaudiaAnastaciaSantanaTelles.pdf> Acesso em: 22 jan., 2020.

THANOO, B.C.; SUNNY, M.C.; JAYAKHRISHNAN, A. Cross-linked chitosan microspheres: preparation and evaluation as a matrix for the controlled release of pharmaceuticals. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. London, v. 44, n.4, p.283-286, 1992.

VALDERRAMA, L.T.; DEL CAMPO, C.M.; RODRIGUEZ, C.M.; DE-BASHAN, L.E.; BASHAN, Y. Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production

using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscula*. **Water Resource**. v. 36, p. 4185–4192, 2002.

VASILIEVA, S. G.; LOBAKOVA, E. S.; LUKYANOV, A. A.; SOLOVCHENKO, A. E. Immobilized microalgae in biotechnology. – **Moscow University Biological Sciences Bulletin**. , v. 71, p.170-176, 2016.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, n. 4-6, p. 113-148, 2000.

WANG, L.; RIDGWAY, D.; GU, T.; MOO-YOUNG, M. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. **Biotechnology Advances**, v. 23, no 2, p. 115-129, 2005.

WANG, M.; YANG, Y.; CHEN, Z.; CHEN, Y.; WEN, Y.; CHEN, B. Removal of nutrients from undiluted anaerobically treated piggery wastewater by improved microalgae. **Bioresource Technology**, v. 222, p. 130-138, 2016.

WANG, Z.; ZHANG, Z.; LIN, Y.; DENG, N.; TAO, T. VE ZHUO, K. Landfill leachate treatment by a coagulation photooxidation process, **Journal of Hazardous Materials**, v. 95, p. 153-159, 2002.

WEI, Q.; HU, Z.; LI, G.; XIAO, B.; SUN, H.; TAO, M. Removing nitrogen and phosphorus from simulated wastewater using algal biofilm technique. **Front. Environ. Sci. Eng.** v. 2, p. 446–451, 2008.

YANG, C.; HUA, Q.; SHIMIZU, K. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, p. 87-102, 2000.

YU, W.; SONG, H.; ZHENG, G.; LIU, X.; ZHANG, Y.; MA, X. Study on membrane characteristics of alginate–chitosan microcapsule with cell growth. **Journal of Membrane Science**, v. 377, p. 214-220, 2011.

ZAIN, M. M.; KOFLI, N. T.; YAHYA, S. R. S. Bioethanol production by calcium alginate-immobilized ST1 yeast system: effects of size of beads, ratio and concentration. **Engineering Journal**, v. 12, n. 4 (Special Issue on Biotechnology), 2011.

ZGUROVSKAYA, L.N., KUSTENKO, N.G. The effect of ammonia nitrogen on divisão photosynthesis and pigment accumulation in *Skeletonema costatum*, *Clateoceros* sp. and *Procentrum micans*. **Her. Oceanology**, v. 8, p. 90-98, 1968.

ZHOU, Z.; LI, G-Y.; LI, Y-J. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase on hybrid alginate-chitosan beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, p. 21-26, 2010.

CAPÍTULO 2

PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DA MICROALGA *Chlorella* sp. ISOLADA DE LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO

RESUMO

As microalgas são organismos unicelulares fotossintetizantes que possuem estrutura celular eucariótica e podem apresentar-se em formas coloniais ou livres. Estes organismos vêm sendo amplamente investigados para aplicação em tratamento de águas residuárias. Seu potencial biotecnológico destaca-se também na produção de bioprodutos, por apresentarem características como boa adaptabilidade e alta taxa de crescimento. Entretanto, a identificação morfológica das espécies é um grande desafio tendo em vista a ampla gama de características apresentadas pelas cepas. A caracterização molecular tem sido uma ferramenta muito importante na identificação de uma espécie ou grupo polifilético. O uso dos marcadores moleculares de genoma nuclear, por exemplo, a amplificação de genes ribossomais do tipo 18S, tem conduzido diversos trabalhos bem sucedidos de caracterização molecular. Todavia, a extração de ácidos nucléicos da *Chlorella* sp. é difícil, dada a natureza quimicamente complexa de suas paredes celulares e variáveis produções de metabólitos). Esta pesquisa pretendeu propor um protocolo para a extração de DNA de *Chlorella* sp. visando sua amplificação com primers DNAr 18S para posterior caracterização molecular. A cepa da *Chlorella* sp. foi isolada do lixiviado do Aterro Sanitário Metropolitano de João Pessoa-PB. A microalga foi cultivada em MBB (Meio Basal Bold) em biorreator em batelada. O DNA genômico total foi extraído pelo método CTAB ((Brometo de Cetiltrimetilamônio) com modificações para microalgas. A análise foi conduzida em triplicata sendo o DNA extraído avaliado qualitativamente por eletroforese e quantitativamente por espectrofotometria. De acordo com as leituras ópticas, foram obtidas quantidades de DNA de 687, 135,6 e 895,2 ng/μL nas três repetições, apresentando valores médios para a razão 260/280 variando entre 1,9 a 2,0. A análise indica que o protocolo foi eficiente na extração do DNA de *Chlorella* sp., resultando em elevada concentração e pureza do DNA extraído, pela remoção bem sucedida de compostos interferentes. A análise dos resultados da amplificação por PCR da região 18S do DNAr de *Chlorella* sp. a partir dos primers; F (5'-CCTGCGGCTTAATTTGACTC-3) e R (5'-GCGAACCAACCGTGACTATT-3'), possibilitou visualizar bandas únicas e de tamanho esperado para os amplicons (~200 pb). Estes dados confirmam a qualidade do DNA extraído e portanto favorece para a caracterização molecular da espécie dessa alga. É esperado que o protocolo aqui descrito seja também eficiente para a extração do DNA de microalgas desse e de outros gêneros.

Palavras Chave: DNA de clorofíceas; Pureza de DNA; Gel de agarose; região 18S; Caracterização molecular.

ABSTRACT

Microalgae are photosynthetic single-celled organisms that have eukaryotic cell structure and can be in colonial or free forms. These organisms have been extensively investigated for application in wastewater treatment. Its biotechnological potential also stands out in the production of bioproducts, as they have characteristics such as good adaptability and high growth rate. However, the morphological identification of the species is a great challenge in view of the wide range of characteristics presented by the strains. Molecular characterization has been a very important tool in the identification of a polyphyletic species or group. The use of molecular markers of the nuclear genome, for example, the amplification of ribosomal genes of the type 18S, has led to several successful studies of molecular characterization. However, the extraction of nucleic acids from *Chlorella* sp. is difficult, given the chemically complex nature of its cell walls and variable metabolite production). This research intended to propose a protocol for the extraction of DNA from *Chlorella* sp. aiming at amplification with DNAr 18S primers for further molecular characterization. The strain of *Chlorella* sp. was isolated from the leachate of the João Pessoa-PB Metropolitan Landfill. The microalgae was grown in MBB (Medium Basal Bold) in a batch bioreactor. The total genomic DNA was extracted using the CTAB method (Cetyltrimethylammonium bromide) with modifications for microalgae. The analysis was carried out in triplicate and the extracted DNA was evaluated qualitatively by electrophoresis and quantitatively by spectrophotometry. According to the optical readings, quantities of DNA of 687, 135.6 and 895.2 ng / μL in the three replications, with average values for the 260/280 ratio ranging from 1.9 to 2.0. The analysis indicates that the protocol was efficient in extracting DNA from *Chlorella* sp., resulting in high concentration and purity of the extracted DNA, through the successful removal of interfering compounds. The analysis of the results of PCR amplification of the 18S region of the DNAr of *Chlorella* sp. From the primers; F (5'-CCTGCGGCTTAATTTGACTC -3) and R (5'-GCGAACCAACCGTGACTATT-3'), made it possible to visualize unique bands of expected size for the amplicons (~ 200 bp). This data confirms the quality of the extracted DNA and therefore favors the face molecular characterization of the species of this algae. It is expected that the protocol described here will also be efficient for the extraction of DNA from microalgae of this and other groups of microalgae.

Key words: Chlorophytes DNA; DNA purity; Agarose gel; 18S region; Molecular characterization.

2.1. INTRODUÇÃO

As microalgas caracterizam um diversificado grupo polifilético, com estimativa da existência entre 200 e 800 mil espécies, das quais alguns milhares são mantidos em coleções e apenas algumas espécies são cultivadas em escala industrial (RATHA & PRASANNA 2012). Dentre estas, as microalgas verdes são relevantes como sistemas modelo para estudos em eucariotos e por apresentarem importância biotecnológica e econômica para a produção de biocombustíveis, captura de CO₂, produção de moléculas com alto valor agregado, e biorremediação.

Em destaque como sistemas modelo estão as culturas de *Chlorella* sp. que foram utilizadas para elucidar a fase não luminosa da fotossíntese por Calvin & Benson, em 1948, posteriormente denominado Ciclo de Calvin (LELIAERT et al., 2012). A unicelular *Chlorella variabilis* foi utilizada como sistema modelo para estudos de interações entre algas e vírus (BLANC et al., 2010). Por outro lado, a microalga unicelular flagelada *Chlamydomonas reinhardtii* foi descrita como sistema modelo para estudos em eucariotos envolvendo a fotossíntese, funções do corpo basal e flagelos, apresentando relevância ainda para aplicações biotecnológicas na biorremediação e na produção de biocombustíveis (MERCHANT et al., 2007). Nos processos biotecnológicos existe uma gama de microalgas que tem sido investigada. Com grande importância industrial, a microalga unicelular *Dunaliella salina* foi descrita pela produção de grandes quantidades de β-caroteno e por seu potencial como matéria-prima para produção de biocombustíveis (GOUVEIA e OLIVEIRA, 2009). Além dessa, *Chlorella* sp. é uma das microalgas mais utilizadas para o desenvolvimento de estudos na área de biologia molecular (KRIENITZ et al., 2015) e aplicações biotecnológicas (PEREZ-GARCIA & BASHAN, 2015), incluindo a fitorremediação de lixiviado de aterro sanitário (SILVA et al., 2020).

O estudo da *Chlorella* sp. no tratamento de lixiviado de aterro sanitário tem sua importância na recuperação de recursos e na produção de uma água residuária com melhor condição sanitária. Entretanto, a aplicação de espécies de microalgas, como *Chlorella* sp., em estratégias biotecnológicas industriais necessita de seu isolamento, identificação e caracterização. Neste sentido, registrou-se a presença dominante do gênero *Chlorella* sp. em todas as amostras analisadas no lixiviado do Aterro Sanitário Metropolitano de João Pessoa/ASMJP- PB, indicando desta forma, que esta cepa precisa ser mais bem caracterizada.

Tradicionalmente, as algas têm sido classificadas por vários critérios, que incluem o tipo de pigmento, a natureza química dos produtos de reserva e pelos constituintes da parede celular, aspectos morfológicos e citológicos, tais como a ocorrência de células flageladas, a estrutura dos flagelos e a presença de um envelope no retículo endoplasmático em torno do cloroplasto (DRAGONE et al., 2010). No entanto, de modo geral, a caracterização de espécies por esses critérios pode levar a interpretações errôneas devido a adaptações locais, plasticidade fenotípica e fases do desenvolvimento dos organismos analisados (HEBERT et al. 2003). Por isso, a caracterização tradicional de espécies tem sido enriquecida ou confirmada por critérios moleculares, embasados muitas vezes na estrutura e função dos genes, as quais são tipicamente conservadas entre indivíduos da mesma espécie.

A caracterização molecular tem sido uma ferramenta de grande valia científica na identificação de uma espécie ou grupo polifilético. O uso dos marcadores moleculares de genoma nuclear, por exemplo, a amplificação de genes ribossomais do tipo 18S, tem conduzido diversos trabalhos bem sucedidos de caracterização molecular, elucidando herança filogenética biparental em indivíduos e populações de animais (SCACCHETTI, 2011), em plantas (SOUZA, 2015), em algas (ABDEL HADI, 2015) e em protozoários (PINHEIRO, 2018).

Sequências genômicas completas de mais de 20 espécies de algas foram encontradas disponíveis em bancos de dados genômicos por GAN et al. (2016). Rathood et al. (2017) encontrou muitas microalgas devidamente identificadas no GenBank (NCBI), por meio de marcadores: i) *que amplificam o genoma nuclear*, a exemplo de *C. reinhardtii* (acesso ABCN000000000; MERCHANT et al., 2007), *Chlorella variabilis* (acesso ADIC01000000; BLANC et al., 2010), *Emiliania huxleyi* (acesso AHAL00000000; READ et al., 2013) e *Parachlorella kessleri* (acesso BBXU000000000.1; OTA et al., 2016); ii) *que amplificam o genoma mitocondrial*, como *Dunaliella salina* (acesso CCAP19/18 – GQ250045; SMITH et al., 2010); e iii) *que amplificam o genoma cloroplastidial*, tais como *Chlorella vulgaris* (acesso AB001684; WAKASUGI et al., 1997) e *C. reinhardtii* (acesso BK000554; MAUL et al., 2002).

Neste contexto, o isolamento de ácidos nucléicos da espécie é uma etapa primordial para sua amplificação e posterior sequenciamento de regiões conservadas capazes de serem caracterizadas por comparação com outras sequências disponíveis em bancos de dados. Frequentemente, procedimentos para isolar material nucléico de alguns grupos de algas falham (VARELA-ÁLVAREZ et al., 2006). Além de apresentarem inerentes dificuldades técnicas resultantes de suas paredes celulares quimicamente complexas e estruturalmente robustas (GERKEN et al., 2013), polissacarídeos, lipídios e compostos fenólicos tipicamente produzidos

por microalgas em abundância interferem no isolamento de ácidos nucléicos de alta qualidade e reações enzimáticas posteriores, como PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) (VARELA-ÁLVAREZ et al., 2006).

Diante do exposto, foi proposto um protocolo para a extração de DNA de *Chlorella* sp. isolada de lixiviado de aterro sanitário do ASMJP- PB, visando sua amplificação com *primers* DNAr 18S para posterior caracterização molecular.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Coleta, identificação do fitoplâncton e cultivo da *Chlorella* sp.

A cepa de *Chlorella* sp. foi isolada de amostras de 400 mL de Lixiviado de Aterro Sanitário do ASMJP-PB coletadas na entrada e saída de cada lagoa de tratamento de lixiviado do aterro sanitário da cidade de João Pessoa (L₁ = decantação, L₂ = anaeróbia I, L₃ = anaeróbia II, L₄ = facultativa e L₅ = recirculação), fixadas em lugol acético na concentração final de 4%, envolvidas em papel alumínio, conduzidas ao laboratório e mantidas em refrigeração a 4° C.

No Laboratório de Microbiologia da EXTRABES pertencente à UEPB, procedeu-se a identificação do fitoplâncton, para isso, 50 mL de lixiviado de cada lagoa (25 ml entrada+25 ml saída) foram centrifugados a 3000 rpm em centrífuga QUIMIS por 15 minutos, sendo o sedimento de 5 mL inoculados em frasco erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL meio ASM-1 (GORHAM et al. 1964 & ZAGATTO e ARAGÃO, 1992).

As amostras foram colocadas em mesa agitadora ORBITAL DE BANCADA NT-145 em velocidade de 80 rpm, temperatura de 28° C e fotoperíodo de 24 horas. Passados 7 dias, os cultivos foram retirados da mesa agitadora, 20 mL dessa solução foram ressuspensos em frascos erlenmeyers de 1L contendo 500mL de meio ASM-1, iluminados por lâmpadas fluorescentes com intensidade de fótons aproximada de 85 $\mu\text{E}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$, sob aeração bomba Boyuc com vazão de 0,16 L. min⁻¹ de ar por biorreator. Transcorrido o período de 21 dias, procedeu-se identificação, utilizando microscópio marca Coleman em objetiva de 400x de aumento.

O sistema de classificação para classes e gêneros seguiu recomendações de Bicudo e Menezes (2006), e, para as espécies foram utilizadas chaves de identificação específicas de cada

grupo. A contagem do fitoplâncton foi realizada por câmara de Utermöhl capacidade de 2 ml da marca CIENLAB, pelo método da sedimentação de Utermöhl (1958). O tempo de sedimentação foi de duas horas (MARGALEF, 1983).

O isolamento da microalga dominante (*Chlorella* sp.) foi realizado pelo método de ágar em placa, preconizado por Guerrero III e Villegas (1982). Para tanto, amostras de fitoplâncton presentes no substrato, foram inoculadas em placas de Petri, pré-esterilizadas a 121°C contendo MBB (Meio Basal de Bold) (BISCHOFF e BOLD, 1963; BOROWITZKA, 1988) com 1,5% de ágar.

O ambiente de cultivo foi mantido em temperatura controlada de aproximadamente 27±1°C através de condicionador de ar da marca Cònsul 12.000 BTU. As amostras foram mantidas em fotoperíodo de 24 horas, sob iluminação de 4 lâmpadas fluorescentes de 40 watts. Passados 21 dias, foi realizado o isolamento usando pipeta de Pasteur. A observação do gênero algal foi procedida em microscópio invertido da marca Coleman em objetiva de 400x, sendo uma amostra unialgal repicada em frascos erlenmeyers contendo 50 ml de MBB, para posterior ressuspensão em 6 frascos erlenmeyers de 2L contendo cada um, 1600mL de MBB.

Passados 15 dias, da cultura unialgal de *Chlorella* sp. foi realizada a iniciação da cultura clonal técnica de isolamento por pescaria (TAVARES e ROCHA, 2003). Para tanto, em câmara de cultivo, uma lâmina de vidro foi flambada, esperou-se esfriar e em seguida em uma das extremidades da mesma foi preparada uma amostra do cultivo da *Chlorella* sp. para observação ao microscópio, na outra extremidade da lâmina foram colocadas de forma separada, 3 gotas de MBB. Uma pipeta de Pasteur foi afinada na chama do bico de Bunsen até formação do capilar. Com observação ao microscópio, uma célula foi conduzida para a gota de MBB que em seguida foi transferida para um tubo de ensaio estéril contendo 10 mL do meio de cultivo. Passados 7 dias, o conteúdo do frasco foi ressuspendido em 50 mL de MBB e mantido em câmara de cultivo. Decorridos 7 dias, os 60 mL de cultivo foram ressuspendidos em 940 mL de MBB. Esse cultivo clonal permaneceu durante 15 dias a 27° C e fotoperíodo de 24 horas. Esta solução foi concentrada para 100 mL por centrifugação a 3500 rpm em centrífuga QUIMIS por 15 minutos. O concentrado foi acondicionado em caixa térmica com gelo em cubo e conduzido para o Laboratório de Biotecnologia (LBiotec) do *Campus* da UFCG localizado em Cuité, PB (6°29'39'' S 36°09'24'' W) para a extração do DNA.

2.2.2. Isolamento do DNA da *Chlorella* sp.

O volume do concentrado algal foi reduzido por sucessivas centrifugações em temperatura ambiente e eliminação do meio de cultura, a 12.000 rpm por 5 minutos, utilizando centrífuga Loccus Nanospin plus. Em seguida, o concentrado de células foi distribuído em 12 tubos de polipropileno (Axygen) de 1,5 mL, os quais foram acondicionados a -20°C em Freezer 32- INTELLIGENT da marca Bosch até o momento da Extração do DNA, após 15 dias.

O DNA genômico total foi extraído usando o método de CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio) descrito por Dellaporta et al. (1983) adequado para espécimes vegetais, com algumas modificações no tocante aos volumes de trabalho adotados, acondicionamento da amostra e também quanto a preparação do tampão de extração. Para isto, seguiu-se as etapas:

I- O conteúdo do concentrado microalgáceo de 6 eppendorfs (150 µL) foi colocado em cadinho congelado e acrescido com 1800 µL de tampão CTAB e 7 µL de β-mercaptoetanol;

II- A amostra foi macerada levemente e em seguida, separada em 2 eppendorfs de 2 mL contendo cada um 900 µL de amostra diluída em tampão de extração;

III- A amostra foi colocada em banho Maria da marca KACIL a 65°C por 30 minutos e em seguida foi conduzida à câmara de fluxo laminar modelo SP-808/6-HI-SPLABOR e adicionada a mesma igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1);

IV- As amostras foram homogeneizadas vigorosamente usando um agitador tipo Vórtex QL-901 a 20°C, por 5 minutos, e centrifugadas a 1200 rpm durante 15 minutos;

IV- Após a centrifugação, o sobrenadante correspondente ao conteúdo genético foi dividido entre 4 eppendorfs, destes, 2 contendo 500µL e 2 com 300µL e em seguida, adicionou-se álcool isopropílico na proporção volumétrica em dobro de cada amostra (1000 e 600 µL);

V- Os 4 eppendorfs foram levados para centrifugação a 12000 rpm, 20 minutos, em centrífuga refrigerada SL 703 (SOLAB). Após a formação do pellet de DNA foi adicionado etanol (75%) gelado passou-se na centrifuga a 12000 rpm a 10 min;

VI- O sobrenadante foi descartado e o pellet resultante colocado em capela de exaustão a 20°C, por 2 horas, para secagem. As amostras correspondentes a 300 µL e 500 µL foram ressuspensas em 25 µl e 30 µl de Tris a 2,5 mM e homogeneizadas manualmente.

2.2.3. Análise do DNA por eletroforese em gel de agarose

O DNA extraído foi analisado quanto à sua integridade, por meio da análise de gel em agarose. Para esse fim, um gel de agarose na concentração de 1% foi preparado em TAE 1x (Ácido acético glacial e EDTA). Para este fim, a amostra foi preparada em triplicata, da seguinte forma: adicionou-se 1µL de tampão de amostra de azul de bromofenol, 1µL de SYBR gold e 10µL de amostra de DNA genômico total extraída. Em seguida, as amostras contendo essa mistura foram aplicadas nos poços de gel em agarose e submetidas a eletroforese, a 100 V, corrente elétrica de 500 mA, potência de 100W por 30 minutos em aparelho Eletrophoresis Power Supply- da marca LOCCUS Biotecnologia. Após a corrida o gel foi visualizado em luz UV em aparelho UVTRANS e fotodocumentado através de programa LPix Image EX da LOCCUS- Biotecnologia.

2.2.4. Análise do DNA por espectrofotometria

A quantificação do ácido nucléico foi conduzida em triplicata através de espectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Waltham, MA). A pureza do DNA foi determinada pelo coeficiente de absorção 260/280 e 260/230, com base no coeficiente máximo absorbância de ácidos nucleicos a 260 nm, e registrada através de programa NanoDrop 2000/2000a. Portanto, uma diminuição nas razões 260/280 e 260/230 nm foram utilizadas como indicador de aumento quantidades de impurezas (SAMBROOK & RUSSELL, 2001).

2.2.5. Amplificação do DNA de *Chlorella* sp. por PCR

Para determinar o possível impacto dos inibidores de amplificação durante a PCR, o DNA foi testado para amplificação por PCR do fragmento gênico ribossomal 18S, utilizando um par de primers específicos relatados por Wan et al. (2011) em seus achados genéticos estudando *Chlorella sorokiniana*, que são 18S F (5'-CCTGCGGCTTAATTTGACTC-3) e 18S R (5'-GCGAACCAACCGTGACTATT-3') sintetizados pela Invitrogen.

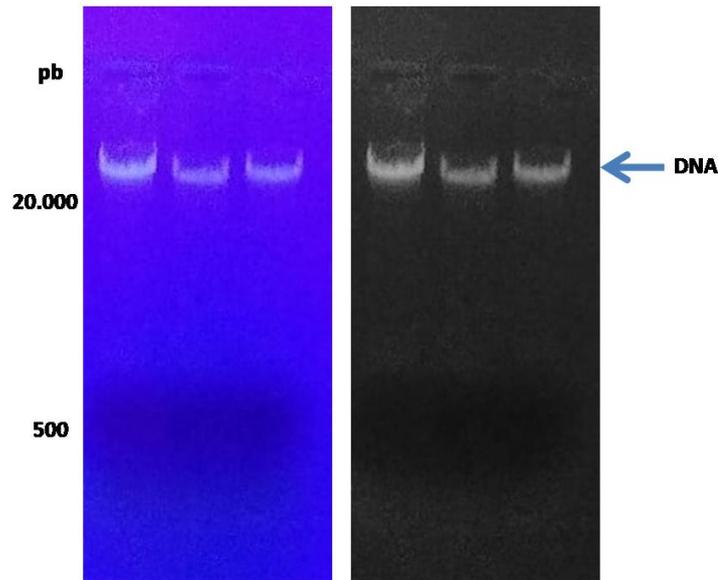
Cada reação de PCR de 25 µL conteve 2,5 µL de tampão de reação 1X, 2,5 µL do mix de dNTPs, 0,75 µL de cada primer a 0,3 µM, 0,1 U de Taq polimerase, todos da marca Invitrogen, 0,1 µL de DNA a 2,0 ng/µL e 17 µL de H₂O estéril Milli-Q.

A amplificação foi realizada em termociclador (Amplitherm, Termal Cyclers, AAKER), por desnaturação preliminar de DNA a 95 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação do modelo de DNA a 95°C por 30 seg. anelamento de primer a 60° C por 45 seg. extensão inicial e 72° C durante 30 seg. e uma extensão final a 72°C durante 5 min. Uma alíquota de 20 µL da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho descreve a extração bem-sucedida do DNA genômico total da *Chlorella* sp. isolada do lixiviado do aterro sanitário do ASMJP- PB, seguindo um protocolo de CTAB comumente utilizado para extração de DNA de espécies vegetais, com adaptações para microalgas. Na Figura 1 está apresentada a eletroforese do DNA em gel de agarose 1% em triplicata.

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1% de DNA genômico total de *Chlorella* sp.



Fonte: Autora (2020)

A partir da análise da Figura 1, é possível observar que o DNA se apresenta íntegro, como banda única, sem a presença de RNA contaminante, degradação ou resquícios nos poços relativos à carboidratos, o que é indicativo de alta qualidade na amostra. A intensidade da banda visualizada sob luz ultravioleta indica uma quantidade de DNA de, pelo menos, acima de 100 ng nas três amostras.

Os dados da estimativa da qualidade e quantidade do DNA visualizados por eletroforese foram confirmados por espectrofotometria (Tabela 1). De acordo com as leituras ópticas, a quantidade de DNA obtida nas três repetições (alga₁, alga₂ e alga₃) foi respectivamente 687, 135,6 e 895,2 ng/μL, perfazendo um total de 1.719 ng/μL. Na Tabela 1 estão apresentados os valores das leituras ópticas do DNA genômico em espectrofotometria NanoDrop.

Tabela 1. Leituras ópticas do DNA genômico total extraído de *Chlorella* sp. pelo método CTAB.

| Amostras | Concentração (ng. μL ⁻¹) | A 260 | A 280 | 260/280 | 260/230 |
|----------|--------------------------------------|--------|-------|---------|---------|
| Alga 1 | 687 | 13,739 | 6,939 | 1,98 | 1,50 |
| Alga 2 | 135,6 | 2,698 | 1,325 | 2,02 | 1,67 |
| Alga 3 | 895,2 | 17,905 | 8,847 | 2,02 | 1,68 |

Uma vez que microalgas cocóides, especialmente *Chlorella* sp., possuem paredes celulares rígidas que dificultam a sua ruptura (FAWLEY & FAWLEY, 2004). Lopez et al. (2017) sugeriram uma fase adicional para promover a ruptura das membranas celulares e subsequente liberação do material genético em protocolos para cada espécie de alga. Já Gerken et al. (2013) sugeriram incluir etapas de homogeneização mecânica, digestão enzimática ou uma combinação destes métodos. Neste trabalho, é relevante destacar que a homogeneização mecânica foi satisfatória para a extração do DNA da Cepa de *Chlorella* sp., com rendimento considerado elevado e suficiente para análises moleculares diversas posteriores.

Conforme análise dos valores médios para a razão 260/280, identificou-se que variaram de aproximadamente 1,9 a 2,0, entre as repetições (Tabela 1). De acordo com Sambrook & Russell (2001), ácidos nucleicos puros apresentam razão 260/280 ~1,85-1,88 para DNA e ~2,0-2,1 para RNA. A pureza determina o quão representativa é a leitura obtida a 260 nm em relação ao DNA presente naquela amostra e, portanto, em relação ao valor calculado para a concentração de DNA. Uma razão 260/280 mais baixa do que 1,8 pode indicar a presença de proteína ou outro contaminante que absorve fortemente a luz ou próximo de 280 nm. Porém, a detecção de proteína contaminante é dependente de baixas concentrações de DNA. Por outro lado, Um aumento na razão 260/280 pode indicar a presença de RNA contaminante que absorve fortemente a 260 nm.

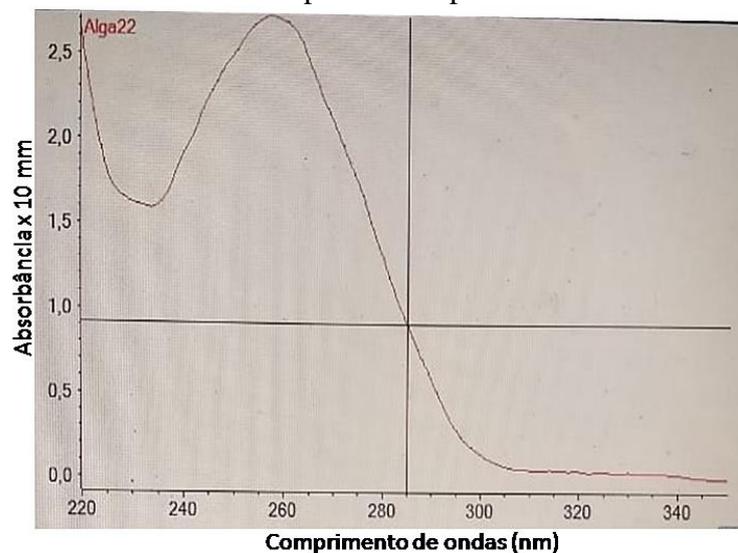
Entretanto, de acordo com o Boletim Técnico da NanoDrop, a razão 260/280 pode sofrer oscilações de $\pm 0,2$ a $0,3$ devido ao pH da amostra, acurácia do espectrofotômetro usado e ainda, a composição de nucleotídeos dos ácidos nucleicos analisados (NANODROP, 2007). Portanto, o DNA extraído pode ser considerado com alto grau de pureza, visto que a razão 260/280 apresentada para as repetições estão dentro da escala de pureza dos ácidos nucleicos (1,9 a 2,0) e contaminação com RNA não foi visualizada por meio da eletroforese em gel.

Um pouco menos utilizada, ou menos conhecida, a razão 260/230 é uma medida secundária de pureza do DNA, quando encontrada entre 2,0 a 2,2. Uma razão 260/230 menor do que a esperada pode indicar contaminação com diversos compostos que absorvem a 230 nm, tais como: EDTA, fenóis, sais de guanidina, carboidratos e algumas proteínas (KOESTER & CANTOR, 2019). Na análise dos dados da Tabela 1, pode-se constatar uma relação média de 1,62 para a absorbância 260/230. Diferentemente dos resultados do presente trabalho, no qual não se fez uso de Kit de extração, Lopez et al. (2017) observaram razão 260/230 na faixa de 0,62 para DNA extraído de *Chlorella sorokiniana*, a partir de sistemas celulares livres e

imobilizados em alginato de cálcio, usando Kit Promega e método Fawley-CTAB, portanto, valores considerados muito baixos, de acordo com os autores, indicativos de que outros contaminantes foram extraídos juntos com o DNA.

O perfil espectrofotométrico do DNA extraído de *Chlorella* sp., neste trabalho, revelou um padrão característico para ácidos nucleicos. Este perfil está em acordo com a descrição do Boletim Técnico da Nanodrop, por apresentar um elevado pico sob absorvância a 260 nm, referente ao DNA (NANODROP, 2007). Na Figura 2 está apresentada uma curva de absorvância gerada no NanoDrop para o DNA da *Chlorella* sp.

Figura 2. Representação da curva de absorvância gerada no nanodrop para DNA de *Chlorella* sp. extraído por CTAB.



Fonte: Autora (2020)

A presença de baixa absorvância a 230 nm observada no perfil espectrofotométrico poderia representar uma baixa presença de contaminantes residuais na amostra. Entretanto, dentre os contaminantes citados acima, que absorvem a 230 nm, a presença de carboidratos, comumente visualizada como fluorescência dentro dos poços no gel de agarose, foi descartada para as três repetições (Figura 1). Os demais compostos não foram utilizados no Protocolo de Extração. Muitas vezes baixas taxas 260/230 têm sido associadas à presença de sal na amostra, especialmente sais de guanidina. A presença de sais nas amostras de DNA e RNA são facilmente removidas por lavagens com etanol 70% gelado, antes de secarem.

Em conjunto, os dados indicam que o protocolo foi eficiente na extração do DNA de *Chlorella* sp., conduzindo a uma alta quantidade e pureza do DNA extraído, pela remoção bem-sucedida de compostos interferentes, tais como proteínas. Entretanto, embora taxas de pureza

sejam importantes indicadores de qualidade, o melhor indicador da qualidade do DNA extraído é que seja funcional em análises posteriores, tais como amplificação por PCR.

2.3.1 Amplificação por PCR da região 18S do DNAr de *Chlorella* sp.

A região do DNA genômico de *Chlorella* sp. que codifica a sub-região S do RNA ribossomal (DNAr 18S), foi especificamente amplificada nas três repetições (Dados não mostrados). Foi possível visualizar bandas únicas, de tamanho esperado para os amplicons (~200 pb). Estes resultados confirmam a qualidade do DNA extraído e sua aplicação para a caracterização molecular da espécie dessa alga. É esperado que o protocolo aqui descrito seja também eficiente para a extração do DNA de microalgas desse e de outros gêneros.

2.4. CONCLUSÃO

Frente à análise dos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que:

- O DNA extraído foi amplificado com sucesso usando primers para DNA ribossomal 18S (os amplicons), sendo obtidos produtos de PCR específicos com tamanhos esperados (pares de bases) e bandas únicas, sugerindo portanto, não ter havido contaminação por outras substâncias interferentes;
- O protocolo estabelecido foi capaz de extrair DNA genômico de *Chlorella* sp. com qualidade e pureza satisfatórias sem a utilização de Kit de extração, podendo este ser aplicado na identificação molecular de Chlorophyceas que são investigadas da biorremediação de águas residuárias;
- A extração do DNA de microalgas é uma ferramenta biotecnológica de grande valia científica, uma vez que, possibilita a realização do sequenciamento e a identificação molecular das espécies constituintes do fitoplâncton que participa no tratamento dos vários tipos de águas residuárias.

REFERÊNCIAS

- ABDEL HADI, S. I. I. Identificação molecular e criopreservação de microalgas verdes (Chlorophyta) isoladas de águas continentais brasileiras. 84 f. Dissertação (mestrado). **Universidade Estadual do Tocantins**, Campus de Botucatu. 2015.
- BICUDO, C.E.M.; MENEZES, M. Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: Chave para identificação e descrições. **Rima**, 508p., 2006.
- BIOMEDICAL CENTER. RNA quality control. 2007. Disponível em: <http://biomedicalgenomi/>. Acesso em: 25 nov. 2020.
- BLANC, G.; DUNCAN, G.; AGARKOVA, I.; BORODOVSKY, M.; GURNON, J.; KUO, A.; SALAMOV, A. The *Chlorella variabilis* NC64A genome reveals adaptation to photosymbiosis, coevolution with viruses, and cryptic sex. **The Plant Cell**, v. 22, p. 2943-2955, 2010.
- DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant DNA minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.1, p.19-21, 1983.
- DRAGONE, G. Third generation biofuels from microalgae. **Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, p.1355–1366, 2010.
- FAWLEY, M.W.; FAWLEY, K.P. A simple and rapid technique for the isolation of DNA from microalgae. **Journal Phycol.** v.40, p. 223–225, 2004.
- GAN, S. Y., LIM, P. E, PHANG, S. M. Genetic and Metabolic Engineering of Microalgae. **In Algae Biotechnology Springer International Publishing**. p. 317-344, 2016.
- GERKEN, H.G., DONOHOE, B., KNOSHAUG, E.P. Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production. **Planta** **237**, p. 239–253, 2013.
- GOUVEIA, L.; OLIVEIRA, A. Microalgae as a raw material for biofuels production. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** v. 36, p. 269-274, 2009.
- HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proc. R. Soc. Lond. B**, v. 270, p. 313-321, 2003.
- KOESTER, G, CANTOR, E. A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers. **New England Biolabs**. Note Technique. 2019. Disponível em: https://www.bioke.com/blobs/downloads/NEB/MVS_Analysis_of_NA_Concentration_and_Purity.pdf. Acesso em 25 nov. de 2020.
- KRIENITZ, L.; HUSS, V.A.; BOCK, C. *Chlorella*: 125 years of the green survivalist. **Trends Plant Sci.** v.20, p.67–69, 2015.

LELIAERT, F.; SMITH, D. R.; MOREAU, H.; HERRON, M. D.; VERBRUGGEN, H.; DELWICHE, C. F.; CLERCK, O. D. Phylogeny and molecular evolution of the green algae. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 31, p.1-46, 2012.

LOPEZ, B. R.; HERNANDEZ, J-P.; BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L.E. Immobilization of microalgae cells in alginate facilitates isolation of DNA and RNA. **Journal of Microbiological Methods**. v.135, p.96-104, 2017.

MAUL, J. E.; LILLY, J. W.; CUI, L.; MILLER, W.; HARRIS, E. H.; STERN, D. B. The *Chlamydomonas reinhardtii* plastid chromosome islands of genes in a sea of repeats. **The Plant Cell**, v. 14, p. 2659- 2679, 2002.

MERCHANT, S. S.; PROCHNIK, S. E.; VALLON, O.; HARRIS, E. H.; KARPOWICZ, S. J.; WITMAN, G. B.; TERRY, A.; SALAMOV, A.; FRITZ-LAYLIN, L. K.; MARÉCHAL-DROUARD, L.; MARSHALL, W. F.; QU, L. H.; NELSON, D. R.; SANDERFOOT, A. A.; SPALDING, M. H.; KAPITONOV, V. V.; REN, Q.; FERRIS, P.; LINDQUIST, E.; SHAPIRO, H.; LUCAS, S. M.; GRIMWOOD, J.; SCHMUTZ, J.; CARDOL, P.; CERUTTI, H.; CHANFREAU, G.; CHEN, C. L.; COGNAT, V.; CROFT, M. T.; DENT, R.; DUTCHER, S.; FERNÁNDEZ, E.; FUKUZAWA, H.; GONZÁLEZ-BALLESTER, D.; GONZÁLEZ-HALPHEN, D.; HALLMANN, A.; HANIKENNE, M.; HIPPLER, M.; INWOOD, W.; JABBARI, K.; KALANON, M.; KURAS, R.; LEFEBVRE, P. A.; LEMAIRE, S. D.; LOBANOV, A. V.; LOHR, M.; MANUELL, A.; MEIER, I.; METS, L.; MITTAG, M.; MITTELMEIER, T.; MORONEY, J. V.; MOSELEY, J.; NAPOLI, C.; NEDELCO, A. M.; NIYOGI, K.; NOVOSELOV, S. V.; PAULSEN, I. T.; PAZOUR, G.; PURTON, S.; RAL, J. P.; RIAÑO-PACHÓN, D. M.; RIEKHOF, W.; RYMARQUIS, L.; SCHRODA, M.; STERN, D.; UMEN, J.; WILLOWS, R.; WILSON, N.; ZIMMER, S. L.; ALLMER, J.; BALK, J.; BISOVA, K.; CHEN, C. J.; ELIAS, M.; GENDLER, K.; HAUSER, C.; LAMB, M. R.; LEDFORD, H.; LONG, J. C.; MINAGAWA, J.; PAGE, M. D.; PAN, J.; POOTAKHAM, W.; ROJE, S.; ROSE, A.; STAHLBERG, E.; TERAUCHI, A. M.; YANG, P.; BALL, S.; BOWLER, C.; DIECKMANN, C. L.; GLADYSHEV, V. N.; GREEN, P.; JORGENSEN, R.; MAYFIELD, S.; MUELLER-ROEBER, B.; RAJAMANI, S.; SAYRE, R. T.; BROKSTEIN, P.; DUBCHAK, I.; GOODSTEIN, D.; HORNICK, L.; HUANG, Y. W.; JHAVERI, J.; LUO, Y.; MARTÍNEZ, D.; NGAU, W. C.; OTILLAR, B.; POLIAKOV, A.; PORTER, A.; SZAJKOWSKI, L.; WERNER, G.; ZHOU, K.; GRIGORIEV, I. V.; ROKHSAR, D. S.; GROSSMAN, A. R. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. **Science, Washington, DC**, v. 318, p. 245-251, 2007.

PEREZ-GARCIA, O., BASHAN, Y. Microalgal heterotrophic and mixotrophic culturing for bio-refining: From metabolic routes to techno-economics. In: PROKOP, A., BAJPAI, R., ZAPPI, M. (Eds.), **Algal Biorefineries II: Products and Biorefinery Design**. Springer, v.19, p. 61–131. 2015.

PINHEIRO, S.N. Caracterização do gene 18s rRNA em parasitos do grupo apicomplexa: uma abordagem aplicada à seleção de marcadores moleculares. Programa de pós-graduação em bioinformática. Dissertação de Mestrado. 77p. **Universidade Federal do Rio Grande do Norte**. 2018.

RATHA, S.K. & PRASANNA, R. Bioprospecting microalgae as potential sources of “Green Energy”- challenges and perspectives (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 48, p.109-125, 2012.

- RATHOD, J.P.; GADE, R.M.; RATHOD, D.R.; DUDHARE, M.A. Review on genetic engineering of microalgae with respect to genomes, selectable marker genes, promoters and reporter genes. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. v.6, n.12, p. 3208-3219. 2017.
- READ, B. A., KEGEL, J., KLUTE, M. J., KUO, A., LEFEBVRE, S. C., MAUMUS, F., AND YOUNG, J. Pan genome of the phytoplankton *Emiliania huxleyi* and its global distribution. **Nature**, v. 499, p. 209-213. 2013.
- SAMBROOK, J., RUSSELL, D.W., 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, NY. Schoebitz, M., López, M.D., Roldán, A., 2013.
- SCACCHETTI, P. C. Mapeamento físico de genes ribossômicos 18S e 5S nos cromossomos de espécies simpáticas do gênero *Gymnotus* (Teleostei, Gymnotiformes, Gymnotidae). 78p. Dissertação (mestrado) - **Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu**, 2011.
- SILVA, M.C.C.P.; ALBUQUERQUE, M.V.C.; RODRIGUES, R. M.M.; RAMOS R.O.; SÁTIRO, J, R.; LOPES, W.; PEARSON, H.W, LEITE, V.D. Remoção de nitrogênio amoniacal por *Chlorella* sp. em diferentes diluições de Lixiviado de aterro sanitário. **Brazilian Journal** v. 6, n. 11, p. 86620- 86631, 2020.
- SMITH, D. R.; LEE, R. W.; CUSHMAN, J. C.; MAGNUSON, J. K.; TRAN, D.; POLLE, J. E. The *Dunaliella salina* organelle genomes: large sequences, inflated with intronic and intergenic DNA. **BMC plant biology**, v. 10, p. 83, 2010.
- SOUZA, D.C.L. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.17, n.3, p.495-503, 2015.
- TAVARES, L. H. S.; ROCHA. O. Produção de Plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para Alimentação de Organismos Aquáticos, São Carlos, **Rima**,105p. , 2003.
- VARELA-ÁLVAREZ, E.; ANDREAKIS, N.; LAGO-LESTÓN, A.; PEARSON, G.A.; SERRÃO, E.A.; PROCACCINI, G.; DUARTE, C.; MARBA, N. Genomic DNA isolation from green and brown algae (Cauleriales and Fucales) for microsatellite library construction. **Journal Phycol.** v. 42, p. 741–745, 2006.
- WAKASUGI, T.; NAGAI, T.; KAPOOR, M.; SUGITA, M.; ITO, M.; ITO, S.; HAMADA, A. Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from the green alga *Chlorella vulgaris*: the existence of genes possibly involved in chloroplast division. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 5967-5972, 1997.
- ZAGATTO, P.A. e ARAGÃO, M.A. Implantação de métodos para avaliação de algas tóxicas. São Paulo, **Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), Relatório Técnico**, 23p. 1992.

CAPÍTULO 3

TRATAMENTO DE LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO APLICANDO *Chlorella* sp. IMOBILIZADA EM DIFERENTES MATRIZES POLIMÉRICAS

RESUMO

Lixiviado de aterro sanitário é uma água residuária de difícil tratamento, por ser detentora de significativas concentrações de material carbonáceo e nitrogenado, além de uma diversificada gama de compostos químicos recalcitrantes. O estudo do tratamento de lixiviado de aterro sanitário aplicando-se microalgas imobilizadas é uma biotecnologia recente e promissora do ponto de vista tecnológico em razão de propiciar a recuperação de nitrogênio e fósforo. Neste trabalho, investigou-se a capacidade de remoção de nitrogênio amoniacal de lixiviado de aterro sanitário previamente diluído por *Chlorella* sp imobilizada em matrizes poliméricas. A *Chlorella* sp. foi coletada e isolada do sistema de lagoas de tratamento de lixiviado do aterro sanitário da cidade de João Pessoa-PB imobilizada em matriz polimérica de alginato/quitosana(AG/QT) e alginato de cálcio(AG) em densidade celular de $5,0 \times 10^4$ célula. mL⁻¹. O sistema de tratamento foi constituído por 5 biorreatores tubulares com capacidade de 0,1L, alimentados por 90 mL com substrato constituído por lixiviado de aterro sanitário(LAS) *in natura* mais esgoto doméstico (ED) com concentração afluyente de nitrogênio amoniacal variando de 41 a 294 mg. L⁻¹. Outro sistema constituído por 3 biorreatores cônicos com capacidade de 0,5 L e volume de trabalho de 210 mL, foi monitorado com igual objetivo, contudo, tendo como substrato, LAS diluído em água destilada. Os ensaios foram realizados em temperatura controlada de 27° C e luminosidade de 85 µE. s⁻¹.m⁻², em diferentes TDH e alimentados em batelada. A análise de MEV e EDS da superfície das esferas indicaram que a matriz possui porosidade e retém as células em seu interior. Foram constatadas eficiências de remoções de nitrogênio amoniacal 40% em 4h no sistema com a microalga imobilizada em AG/QT com concentração afluyente média de 240 mg.L⁻¹ de nitrogênio amoniacal. A *Chlorella* sp. imobilizada em alginato de cálcio apresentou eficiência de remoção de N- amoniacal de LAS diluído em água destilada em todos os ensaios realizados em concentrações afluentes de 41 a 107 mg.L⁻¹, sendo registradas eficiências remoções entre 81 e 97% em TDH de 2h. A *Chlorella* sp. apresentou eficiência de remoção de N- amoniacal de LAS diluído em água destilada na faixa de 49 a 98% com incrementos de oxigênio dissolvido de até 192% em 5 h de monitoramento. A variação de pH do meio reacional foi de 0,5 unidades. A turbidez foi crescente em todos os sistemas, iniciando com 3,0, 4,5 e 8,0 NTU respectivamente para os sistemas de concentração de nitrogênio amoniacal afluyente de 50, 98, 198 mg.L⁻¹apresentando ao final, valores respectivos de 70, 61 e 119 NTU. Os resultados obtidos neste estudo apontam para as vantagens do uso de microalgas imobilizadas no tratamento de águas residuárias, na remoção de poluentes e produtos químicos tóxicos de forma ecologicamente segura com benefícios adicionais de recuperação e reciclagem de recursos, com destaque para o potencial fitorremediativo da *Chlorella* sp. na remoção de nitrogênio amoniacal de lixiviado de aterro sanitário.

Palavras-chave: remoção de nutrientes; fitorremediação; microalgas imobilizadas; nitrogênio amoniacal; alginato de cálcio; quitosana.

ABSTRACT

Landfill leachate is wastewater that is difficult to treat, as it has significant concentrations of carbonaceous and nitrogenous material, in addition to a diverse range of recalcitrant chemical compounds. The study of landfill leachate treatment using immobilized microalgae is a recent and promising biotechnology from the technological point of view because it promotes the recovery of nitrogen and phosphorus. In this work, the ability to remove ammonia nitrogen from landfill leachate previously diluted by *Chlorella* sp. immobilized in polymeric matrices was investigated. *Chlorella* sp. was collected and isolated from the leachate treatment pond system of the landfill in the city of João Pessoa-PB immobilized in a polymeric matrix of alginate / chitosan (AG / QT) and calcium alginate (AG) in a cell density of 5.0×10^4 cell.mL⁻¹. The treatment system consisted of 5 tubular bioreactors with a capacity of 0.1 L, fed by 90 mL with substrate consisting of landfill leachate (LAS) *in natura* plus domestic sewage (ED) with an affluent concentration of ammoniacal nitrogen ranging from 41 to 294 mg. L⁻¹. Another system consisting of 3 conical bioreactors with a capacity of 0.5 L and a working volume of 210 mL, was monitored with the same objective, however, having LAS as a substrate diluted in distilled water. The tests were performed at a controlled temperature of 27° C and a brightness of 85 μ E. s⁻¹.m⁻², in different TDH and fed in batch. The analysis of SEM and EDS on the surface of the spheres indicated that the matrix has porosity and retains the cells inside. Efficiency of 40% ammoniacal nitrogen removal was verified in 4 hours in the system with the microalgae immobilized in AG / QT with an average affluent concentration of 240 mg.L⁻¹ of ammoniacal nitrogen. *Chlorella* sp. immobilized in calcium alginate showed efficiency in removing L-ammoniacal NL diluted in distilled water in all tests performed in affluent concentrations from 41 to 107 mg.L⁻¹, with removal efficiencies between 81 and 97% being recorded in 2h HRT. *Chlorella* sp. showed efficiency in removing N-ammonia from LAS diluted in distilled water in the range of 49 to 98% with increments of dissolved oxygen of up to 192% in 5 h of monitoring. The pH variation of the reaction medium was 0.5 units. Turbidity was increasing in all systems, starting with 3.0, 4.5 and 8.0 NTU respectively for the 50, 98, 198 mg.L⁻¹ affluent nitrogen concentration systems, with respective values of 70, 61 and 119 NTU. The results obtained in this study point to the advantages of using immobilized microalgae in the treatment of wastewater, in the removal of pollutants and toxic chemicals in an ecologically safe way with the additional benefits of resource recovery and recycling, with emphasis on the phytoremediation potential of *Chlorella* sp. in the removal of ammoniacal nitrogen from landfill leachate.

Key Words: nutrient removal; phytoremediation; immobilized microalgae; ammoniacal nitrogen; calcium alginate; chitosan.

3.1. INTRODUÇÃO

A expressiva geração de resíduos sólidos urbanos (RSU) pela sociedade fomentou a construção de aterros sanitários, objetivando propiciar destinação final mais adequada aos resíduos, reduzindo os impactos ambientais negativos ao meio ambiente. Apesar do desenvolvimento de políticas públicas visando à recuperação desses resíduos (logística reversa, reciclagem, compostagem) a disposição final em aterros sanitários ainda é o principal método de destinação final dos resíduos na maioria dos países em desenvolvimento (MOJIRI et al., 2017).

O aterro sanitário opera como um biorreator anaeróbio que recebe uma massa de resíduo sólidos urbanos, extremamente, complexa e heterogênea propiciando-na reações de naturezas físicas, químicas e biológicas (RENDRA et al., 2007; YAZDANI et al., 2015). Durante estas reações, é gerado o lixiviado que é um resíduo líquido, contendo substâncias químicas que contêm elevado potencial poluidor (BAKRAOUY et al., 2017).

Nesse sentido, a composição química de lixiviado de aterro sanitário é extremamente complexa, uma vez que, mesmo apresentando concentrações significativas de matéria orgânica, a relação Demanda Bioquímica de Oxigênio/Demanda Química de Oxigênio (DBO_5 /DQO) gira em torno de 0,25, denotando que a matéria orgânica presente não é de fácil biodegradação. Contudo, outras espécies químicas, como por exemplo, elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal ($N-NH_4^+$) e determinadas situações, tais como a presença de metais pesados, sempre estão inseridos na sua composição química (LEITE et al., 2017), sendo importante enfatizar que sua composição pode mudar de acordo com a idade do aterro e o tipo de resíduo (PENG, 2013).

O uso de águas residuárias como fonte de água e nutrientes para o cultivo de algas traz vantagens econômicas e ambientais. A fitorremediação de águas residuárias pode ser uma maneira mais eficiente de tratamento em comparação aos processos físicos, químicos e biológicos convencionais, esse resíduo líquido é uma fonte de nutrientes disponível e de baixo custo para o cultivo de microalgas (GARCIA et al., 2020). A fitorremediação refere-se à assimilação ou degradação de compostos orgânicos e inorgânicos (carbono, nitrogênio ou fósforo), metais e contaminantes emergentes em águas residuárias por microalgas, macroalgas e cianobactérias (CUELLAR- BERMUDEZ et al., 2017).

Nesse viés as microalgas são capazes de assimilar compostos nitrogenados inorgânicos e fósforo total e reduzir a concentração de matéria orgânica dissolvida nas águas residuárias. Os nutrientes são assimilados e transformados dentro da célula, sendo incorporados em ácidos nucleicos e proteínas promovendo o crescimento de biomassa (JIA & YUAN, 2016).

Consequentemente, inúmeras vantagens são favoráveis ao uso de microalgas, destacando, custo, eficiência, formação mínima de lodo, poder de sequestro de gases de efeito estufa, baixo consumo de energia e potencial produção de biomassa útil (ZHOU et al., 2014; LYON et al., 2015). Neste sentido, a fitorremediação surge como janela de possibilidades no tratamento do lixiviado.

Diversas microalgas são aplicadas no tratamento de águas residuárias, com destaque para os estudos sobre a classe das Chlorophyceas. Neste grupo de microalgas, o gênero *Chlorella* tem sido investigado no tratamento de diversas águas residuárias (SILVA, 2011). A *Chlorella vulgaris* apresenta forma esférica, diâmetro variando 5 e 10 µm, parede celular robusta em três camadas, constituída por hemiceluloses de diferentes composições, razão da extraordinária estabilidade mecânica dessas algas, possibilitando suportar grandes cargas de pressão, favorecendo desta forma, sua aplicação para cultivo em escala industrialmente relevante (TAKEDA, 1988).

As microalgas tem sido aplicadas no tratamento de águas residuárias em sistemas suspensos (SILVA et al., 2018).

A aplicação de algas imobilizadas para a assimilação de nutrientes de águas residuárias apresenta-se como uma tecnologia economicamente viável, que não requer grandes áreas e uso de produtos químicos, a exemplo dos sistemas de microalgas suspensas. As microalgas imobilizadas assimilam o fósforo inorgânico para seu metabolismo, e, através da fotossíntese, promovem condições ambientais para que se desenvolvam outros mecanismos de remoção química, tais como a sorção e a precipitação do fosfato na matriz imobilizante (SILVA et al., 2017) e nos sistemas imobilizados (PEARSON et al., 2011; MUTJABA et al., 2017; WHITTON et al., 2018)

Nesse universo, 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 biorreator. A imobilização de microrganismos na forma de biofilmes, flocos e pellets é um fenômeno comum na natureza (PRADELLA, 2001).

A matriz de imobilização poderá ser um polímero sintético ou de origem natural, sendo necessário atender a certos requisitos, tais como; fototransparência, não toxicidade e estabilidade no meio de crescimento de algas (FIERRO et al., 2008). Além da colheita simples de biomassa, a matriz de imobilização apresenta a vantagem de uso de cultura de elevada densidade e proteção de células de algas contra bactérias ou predadores naturais. Entre outras matrizes naturais de imobilização, como ágar, alginato ou colágeno, a quitosana obtida da quitina é um material frequentemente usado (BLANK et al., 2016).

O alginato é um polissacarídeo natural biocompatível e biodegradável utilizado na imobilização de proteínas e células, devido às suas vantagens significativas, como a boa biocompatibilidade, baixo custo, fácil disponibilidade e simplicidade de preparação (LU et al., 2005). Enquanto a quitosana é um polímero insolúvel em água, contudo pode ser solubilizado em ácido acético através de formação do seu acetato (THANOO et al., 1992). Quimicamente é o $\beta(1\rightarrow4)$ -2-amino-2-desoxi-D-glicose, obtido pela hidrólise dos grupos aminoacetil da quitina, polissacarídeo abundante, componente estrutural das carapaças protetoras de crustáceos (KAS, 1997).

A investigação das microalgas imobilizadas na recuperação de nutrientes e metais pesados de águas residuárias tem sido ampliada. Filippino et al. (2015), avaliaram o desempenho de microalgas imobilizadas em um sistema contínuo de tratamento na remoção de PO_4^{3-} com concentração entre 0,4 e 1,8 mg. L⁻¹. Foi obtida remediação na faixa de 60 a 100% em TDH de 12 horas e 0 a 40% em TDH de 6,5 horas sob diferentes condições de iluminação. Valdez et al. (2018) monitoraram biorreatores com capacidade de 500 mL, aplicando *Chlorella* sp. imobilizada em esferas de alginato para processos de biorremediação de cádmio em baixas concentrações. Foram obtidas remoções de 59,7%, em concentração de 20 ppm de Cd com TDH de 80 minutos.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho da Chlorophyceae, *Chlorella* sp. imobilizada em matriz de alginato de cálcio e quitosana, na remoção de nitrogênio amoniacal de lixiviado de aterro sanitário em biorreatores de diferentes geometrias alimentados em regime de batelada.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Considerações Gerais

A parte experimental desta pesquisa foi realizada na Estação Experimental de Tratamentos Biológicos de Esgotos Sanitários (EXTRABES), em uma área física da Universidade Estadual da Paraíba/ CAGEPA, localizada na cidade de Campina Grande no estado da Paraíba– PB, Região Nordeste do Brasil (7°13'11'' Sul, 35°52'31'' Oeste). O lixiviado de aterro sanitário (LAS) foi coletado no Aterro Sanitário Metropolitano da cidade João Pessoa – ASMJP, localizado na fazenda Mumbaba III, próximo a BR-101(7°13'00'' S e

34°57'11'' W). O esgoto doméstico (ED) utilizado foi coletado no reservatório de acumulação instalado no residencial Monte Carlo, o qual se localiza ao lado da EXTRABES.

3.2.2. Reagentes

Para o cultivo da *Chlorella* sp. e a produção das esferas de alginato de cálcio foram utilizados os seguintes reagentes:

CaCl₂ (99,99% puro), alginato (99,99%) foi adquirido na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), quitosana marca POLYMAR, Água ultra pura do tipo 1+ (18,2 MΩ cm), obtida com o purificador de água Master System MS 2000 (Gehaka, São Paulo, SP, Brasil), foi utilizada na preparação das soluções de trabalho.

O meio Basal Bold's (BBM) para cultivo de *Chlorella* sp. foi composto de NaNO₃ (250 mg L⁻¹), MgSO₄ · 7H₂O (75 mg L⁻¹), NaCl (25 mg L⁻¹), K₂HPO₄ (75 mg L⁻¹), KH₂PO₄ (175 mg L⁻¹), CaCl₂ · 2H₂O (25 mg.L⁻¹), ZnSO₄ · 7H₂O (8.82 mg L⁻¹), MnCl₂ · 4H₂O (1,44 mg L⁻¹), MoO₃ (0.71 mg.L⁻¹), CuSO₄ · 5H₂O (1,57 mg L⁻¹), Co (NO₃)₂ · 6H₂O (0,49 mg L⁻¹), H₃BO₃ (11,42 mg. L⁻¹), Na₂ EDTA (50 mg L⁻¹), KOH (31 mg L⁻¹), FeSO₄ · 7H₂O (4,98 mg L⁻¹).

3.2.3. Isolamento, Cultivo e Curva de crescimento da *Chlorella* sp.

A cepa de *Chlorella* sp. foi isolada de amostras de Lixiviado de Aterro sanitário (LAS). O isolamento da microalga foi realizado pelo método de ágar em placa, preconizado por Guerrero III e Villegas (1982). Para tanto, amostras de fitoplâncton presentes no substrato, foram inoculadas em placas de Petri, pré-esterilizadas contendo MBB (Meio Basal de Bold) (BISCHOFF e BOLD, 1963; BOROWITZKA, 1988) com 1,5% de ágar.

O ambiente de cultivo foi mantido em temperatura controlada de aproximadamente 27±1°C através de condicionador de ar da marca Cònsul 12.000 BTU. As amostras foram mantidas em fotoperíodo de 24 horas, sob iluminação de 4 lâmpadas fluorescentes de 40 watts. Passados 21 dias, foi realizado o isolamento usando pipeta de Pasteur. A observação do gênero algal foi procedida em microscópio invertido da marca Olemann em objetiva de 400 ×, sendo uma amostra unialgal repicada em frascos erlenmeyers contendo 50 ml de MBB, para posterior

ressuspensão em frascos erlenmeyers de 2L contendo 1600mL de MBB esterilizado a 121°C por 15 minutos e resfriado em temperatura ambiente.

Para definição da melhor fase de crescimento da *Chlorella* sp. para ser procedida a imobilização, foi realizada uma curva de crescimento com TDH de 336 h. O experimento foi conduzido em triplicata, utilizando-se três frascos erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de MBB, e 2 mL de cultura de *Chlorella* sp. em final de fase logarítmica. As amostragens foram feitas a cada 48 h em câmara de Neubauer, usando-se microscópio óptico modelo COLEMAN. A determinação da densidade celular seguiu o que está preconizado por Tavares e Rocha (2003), aplicando-se a Equação 1.

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

3.2.4. Procedimentos de imobilização da *Chlorella* sp. / Preparação do substrato de alimentação

A produção das esferas com *Chlorella* sp. imobilizada, foi realizada pela técnica de engaiolamento, adaptada de Wang et al. (2005). Para tanto, foram adotados os seguintes protocolos de preparação dos compostos:

- Alginato de sódio: foi preparada uma amostra contendo solução de alginato de sódio a 8% (m/v). Sendo essa amostra esterilizada durante 15 minutos a 121° C em autoclave modelo PRISMATEC. A solução foi resfriada em temperatura ambiente para 25° C.
- Cloreto de cálcio: 4,4 g de Cloreto de cálcio P.A foram diluídos em 100 ml de água destilada, sendo esta solução (0,3 M) em seguida autoclavada a 121° C durante 15 minutos e, posteriormente, resfriada a temperatura ambiente.
- 1 litro de meio de cultivo com *Chlorella* sp. em fase estacionária foi centrifugado a 4500 rpm por 15 minutos em Centrífuga QUIMIS, sendo seu volume concentrado para 100 mL.
- Imobilização da *Chlorella* sp. em alginato de cálcio: as esferas com *Chlorella* sp. imobilizada foram produzidas utilizando bomba peristáltica modelo MILAN conectada em um tubo de silicone com 4 mm de diâmetro e vazão de 10 mL min⁻¹. A solução alga/alginato em proporção 1:1, foi gotejada em solução receptora de CaCl₂ 0,3 M sob agitação de 50 rpm em agitador Fanem Modelo 258 a uma distância de 15 cm, produzindo aproximadamente 91 esferas por minuto, cada uma com volume médio de 0,0335 cm³ e diâmetro de 4mm, mantidas imersas

nesta solução por 60 minutos visando o aumento de sua resistência mecânica. Em seguida, foram lavadas com água destilada e preservadas a temperatura a 4°C. Foram produzidas 1904 esferas a cada 100mL de solução alga/alginato.

- Imobilização da *Chlorella* sp. em Alginato/Quitosana: para a solubilização da quitosana foi utilizado o ácido acético P.A em diluições de 2% e 1,0% (v/v) em água destilada. Foi preparada uma solução de quitosana a 2%(m/v). Essa solução foi levada para agitador magnético Tecnal-TE-085 por 2h a 60°C sob agitação de 60 rpm até diluição completa do polímero. Após preparada, a solução foi resfriada em temperatura de 25°C. A solução foi misturada com a solução de alginato a 2%(m/v) na proporção 1:1 produzindo uma blenda polimérica. Os polímeros foram misturados manualmente até homogeneização completa, em seguida, agitados a 200 rpm por 30 minutos em agitador magnético FANEN modelo 257. Após resfriada, a blenda foi adicionada uma solução concentrada de algas na proporção 1:1. Na formação das esferas, a solução alga-alginato-quitosana, foi aduzida por bomba peristáltica com vazão de 15 mL.min⁻¹ através de um tubo de silicone com 80 cm e 4 mm de diâmetro. A solução alga/AG/QT foi gotejada na solução de CaCl₂ 0,3 M.

- MEV das Esferas com algas imobilizadas: visando avaliar a capacidade de transferência de massa através do polímero, procedeu-se a caracterização micro estrutural das esferas com algas imobilizadas, realizada em colaboração com a EMBRAPA Agroindústria Tropical, localizada em Fortaleza – CE; através da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando equipamento VEGA3 TESCAN, as imagens foram obtidas através do detector de elétrons retroespalhados, de forma a identificar a microestrutura da superfície do material, os aumentos utilizados para as micrografias foram de 500, 50 e 10µm.

- Preparação do substrato de alimentação: Nesse estudo, o substrato foi constituído por Esgoto Doméstico (ED) adicionado de Lixiviado de Aterro Sanitário (LAS) em diferentes proporções, visando uma concentração definida de nitrogênio amoniacal afluente. Também foi preparado o LAS em água destilada para realizar estudos em diferentes concentrações de N-amoniacal afluente e menor turbidez para favorecer a passagem da luz. O ED apresentou concentração média de nitrogênio amoniacal na faixa de 96 mg. L⁻¹ para 2730 mg. L⁻¹ do LAS. Por exemplo, na preparação de um substrato com concentração afluente de 200 mg. L⁻¹ de nitrogênio amoniacal, foram usados 960,5 mL de ED (92 mg. L⁻¹ de N-amoniacal) e 39,5 mL de LAS (108 mg. L⁻¹ de N- amoniacal). O ED e o LAS foram caracterizado quimicamente, conforme métodos e instrumentos apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros utilizados para caracterização química do lixiviado/ Método analítico/ Equipamento.

| Parâmetro | Método Analítico (APHA, 2012) | Equipamento (marca/modelo) |
|------------------|---|---|
| DBO ₅ | Winkler | 5210 B. APHA et al. (2012) |
| Turbidez | Nefelométrico 2130 B | MS TECNOPON TB1000P |
| Fósforo total | 4500-P-C | FEMTO 700 Plus- |
| Ortofosfato, | 4500-P-B | FEMTO 700 Plus- |
| Amônia | 4500-NH ₃ | TECNAL- TE-0363 |
| NTK | 4500-N _{org} | TECNAL/TE-0364 |
| DQO | 5220 C. | TECNAL/TE -0364 |
| SST | 2540 D | QUIMIS/Q334M |
| pH | Potenciométrico 4500 C. | HANNA Instruments/HI2300 |
| Temperatura | Eletrométrico 4500 G | HANNA Instruments/HI2221 |
| Cátions | Grupo funcional CARBOXYLIC/PHOSPHONIC ACID, hidrofobicidade média-baixa. | Cromatógrafo iônico Dionex ICS- 1100 da Thermo Scientific acoplado ao amostrador automático Dionex AS-DV |
| Ânions | Grupo funcional ALKYL/ALKANOL QUATERNARY AMMONIUM, hidrofobicidade baixa. | Cromatógrafo iônico Dionex ICS- 1100 da Thermo Scientific |

Para quantificação dos cátions (Mg²⁺, K⁺ e Na⁺) do lixiviado a amostra foi diluída na proporção 2:1 e filtrada em membrana de fibra de vidro de 0,45 µm e em seguida 0,22µm. Na fase móvel foi utilizado o H₂SO₄ 10mM e uma coluna de 2x250mm, capacidade da coluna de 0,7 meq/coluna, grupo funcional CARBOXYLIC/PHOSPHONIC ACID, hidrofobicidade média-baixa. Na quantificação dos ânions (NO³⁻ e SO₄²⁻), amostra foi injetada no cromatógrafo iônico da DIONEX-THERMO usando, como fase móvel, uma mistura de carbonato 4,5 mM e bicarbonato 0,8 mM, sendo usada coluna 2x250mm com capacidade da coluna de 80 µmeq/coluna grupo funcional ALKYL/ALKANOL QUATERNARY AMMONIUM e hidrofobicidade baixa.

• Estudo do pH em diferentes matrizes imobilizantes: objetivando avaliar a interferência da matriz imobilizante no processo fotossintetizante microalgáceo, foi realizado um estudo de pH com *Chlorella* sp. imobilizada em matriz polimérica sob 3 tratamentos:

- i) Em esferas alginato- AG a 4%(m/v);
- ii) Em esferas alginato/quitosana AG/QT em proporção 1:1 e concentração polimérica final de 4%, tendo sido a quitosana dissolvida em ácido acético em concentração (v/v) de 2%;

iii) Em esferas alginato/quitosana AG/QT em proporção 1:1 e concentração polimérica final de 4%, tendo sido a quitosana dissolvida em ácido acético em concentração (v/v) de 1%.

Foram monitorados 3 biorreatores tubulares de vidro pyrex transparente, tendo uma torneira na parte inferior, 2 cm de leito fixo de fibra de vidro, estando recheado, por 0,05L de esferas, aproximadamente 680 ($7,55$ esferas/mL substrato), 42% de espaço vazio e TDH de 7h. O biorreator foi alimentado com 90 mL de substrato constituído por 95% de esgoto doméstico e 5% lixiviado de aterro sanitário em regime de batelada com amostragem a cada 1 hora de contato para leitura de pH.

3.2.5. Caracterização dos biorreatores e das condições de realização do Experimento

Durante o período experimental (julho a novembro de 2018), foram monitorados 5 biorreatores tubulares de vidro pyrex transparente, com 0,1L de capacidade, tendo uma torneira na parte inferior, 2 cm de leito fixo de fibra de vidro. O recheio se constituiu de 0,06L de esferas com *Chlorella* sp. imobilizada em AG/QT e AG, apresentando relação de $10,2$ esferas/mL substrato e 42% de espaço vazio. O substrato foi constituído por diferentes volumes de LAS adicionado ao ED, visando obter concentrações de nitrogênio amoniacal afluentes entre 50 e 300 de mg.L⁻¹.

Aplicou-se um Planejamento Fatorial em dois níveis, 2^3 , com três variáveis controladas (temperatura, TDH e concentração de N-amoniaco afluente), visando identificar as melhores condições operacionais para a remoção de N-amoniaco. Foram testados 3 TDH (5,6 e 7h).

Antes do preenchimento das colunas, as esferas foram submetidas ao seguinte tratamento: retiradas do escuro e temperatura de 4°C, e, após atingirem a temperatura ambiente, foram imersas em LAS diluído em água destilada em concentração de 50 mg de N-amoniaco por 3 horas em exposição de 4 lâmpadas fluorescentes ($85\mu\text{E}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) e temperatura 27°C. A alimentação do sistema procedeu-se pela extremidade superior, usando bomba peristáltica da marca MILAN, a 20 rpm, vazão afluente de $8,6\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, até que o substrato preenchesse todo o espaço vazio do biorreator deixando imersas todas as esferas. Os ensaios ocorreram em temperatura de 27°C, nos quais, a cada 1 hora, foi coletada uma alíquota de 20 ml para avaliação do pH e N- amoniaco. Após 4 horas de monitoração, o biorreator foi esvaziado pela torneira inferior, envolvido em papel alumínio e as lâmpadas foram apagadas até a realização do próximo ensaio.

Na Etapa III, o sistema foi constituído por 4 biorreatores cônicos (frascos erlenmeyers) com capacidade de 500 mL, volume útil de 200 mL de substrato (LAS diluído em água destilada) e 50 mL de esferas com algas imobilizadas, aproximadamente $6,86 \times 10^2$ esferas, com densidade celular de $5,49 \times 10^4$ células.mL⁻¹, mantidos em intensidade luminosa aproximada de 85 $\mu\text{E} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ e fotoperíodo de 12 horas. O controle positivo, foi alimentado com substrato em concentração de N- amoniacal afluyente de aproximadamente 98 mg.L⁻¹ e 50 mL de esferas de alginato de cálcio a concentração (m/v) de 2%.

Os sistemas foram alimentados com LAS diluído nas concentrações de N- amoniacal afluyente de 50, 98 e 195 mg. L⁻¹. Foi realizada uma amostragem com volume de 40 mL de efluente tratado a cada 120 horas até TDH de 360 horas, para análise de pH, turbidez, oxigênio dissolvido e nitrogênio amoniacal. A turbidez do substrato foi determinada em NTU (Unidade Nefelométrica de Turbidez) e realizada em duplicata com uso de turbidímetro (TB-1000P- MS TECNOPON). O oxigênio dissolvido foi quantificado em oxímetro (AT 155 da marca ALFAKIT).

Houve a realização da análise de MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura) e EDS (Espectroscopia por Energia Dispersiva) da superfície de esferas com algas imobilizadas em AG de início e término dos ensaios com concentração de N- amoniacal afluyente de 50, 98 e 195 mg.L⁻¹. As análises foram realizadas através da técnica de elétrons primários em aparelho TM-1000 da marca HITACHI equipado com um aparelho EDS BRUKER AXS no CERTBIO - Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste- UFCG- Campus I.

Visando diminuir a turbidez do substrato para favorecer a passagem da luz e conseqüentemente o processo fotossintetizante, na Etapa III, o LAS foi diluído em água destilada. As alterações implementadas, assim como as características operacionais das três etapas estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Características operacionais das etapas da pesquisa.

| CARACTERIZAÇÃO | ETAPA I | ETAPA II | ETAPA III |
|--|-----------------------|-----------------------|----------------------------|
| Volume do biorreator | 0,1 L | 0,1 L | 0,5 L |
| Geometria do biorreator | Tubular | Tubular | Cônico |
| Origem do substrato | ED+LAS | ED+LAS | Água destilada+LAS |
| Polímero imobilizante | AG/QT | AG | AG |
| Quantidade de esferas | 816 | 816 | 680 |
| Densidade celular (cel. mL ⁻¹) | 5,0×10 ⁴ | 5,0×10 ⁴ | 5,04×10 ⁴ |
| TDH | 4 e 5(h) | 2 (h) | 15 dias |
| Regime de alimentação | Batelada intermitente | Batelada intermitente | Batelada intermitente |
| Parâmetros avaliados | pH/N-amoniacal | pH/OD/N-amoniacal | pH/OD/Turbidez/N-amoniacal |

3.2.6. Análise Estatística

O planejamento fatorial é uma ferramenta que se aplica quando se deseja estudar o efeito de duas ou mais variáveis de influência em um determinado experimento. A realização dos ensaios com algas imobilizadas em esferas AG/QT, seguiu um planejamento experimental design full fatorial 2⁽²⁻⁰⁾ (DOE 2⁽²⁻⁰⁾) com duplicata do ponto central. As variáveis independentes foram o TDH (5, 6 e 7 horas) e o % de LAS (5, 7,5 e 10 %). As variáveis dependentes monitoradas foram OD (mg L⁻¹) e a remoção N-amoniacal (mg L⁻¹). A ANOVA, a superfície de resposta e o Diagrama de Pareto foram obtidos para um limite de confiança de 95% e empregados na interpretação dos resultados obtidos, através dos softwares Microsoft Excel 2013 e Statistic 8,0.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Caracterização química do LAS e do ED

O pH do lixiviado *in natura*, durante o período de realização da parte experimental do trabalho ficou em torno de 8,6 e isto significa dizer que da concentração total de nitrogênio amoniacal, 94,7% (percentagem em volume) se encontrava na forma ionizada, favorecendo

desta forma, a maior concentração de amônia ionizada (em torno de 94,7% de NH_4^+) em relação à amônia gasosa (aproximadamente 5,3% de NH_3) esta última, sendo mais tóxica às algas. Este valor obtidos para o pH, apresenta-se dentro da faixa de pH (5,7 – 8,6) encontrada por Souto e Povinelli (2007) para aterros sanitários brasileiros. A Caracterização química do LAS e do ED está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3. Caracterização química dos efluentes usados na composição do substrato.

| PARÂMETROS | LAS | ED |
|---|-------|-----|
| pH | 8,6 | 7,1 |
| Alcalinidade Total (mg $\text{CaCO}_3\text{L}^{-1}$) | 8150 | 576 |
| Ácidos graxos Voláteis($\text{H}_{\text{Ac}}\text{L}^{-1}$) | 472 | 200 |
| DQO total (mg O_2L^{-1}) | 4238 | 690 |
| DQO solúvel (mg O_2L^{-1}) | 3838 | 352 |
| NTK (mg L^{-1}) | 2790 | 115 |
| Nitrogênio Amoniacal (mg L^{-1}) | 2730 | 96 |
| Nitrogênio Orgânico (mg L^{-1}) | 60 | 19 |
| Sólidos Totais (mg L^{-1}) | 11407 | 997 |
| Sólidos Suspensos Totais (mg L^{-1}) | 577 | 347 |
| Sólidos Suspensos Voláteis (mg L^{-1}) | 330 | 312 |
| Fósforo Total (mg PL^{-1}) | 17,0 | 8,3 |
| Ortofosfato (mg $\text{P-PO}_4^{3-}\text{L}^{-1}$) | 13,0 | 3,5 |

Fonte: Autora (2020)

Considerando as magnitudes apresentadas para o ED na Tabela 3, constata-se que os parâmetros químicos que caracterizam o esgoto como forte são: DQO total (690 mg O_2L^{-1}), NTK (115 mg N.L^{-1}), N-NH_4^+ (96 mg N.L^{-1}) e sólidos totais (997 mg L^{-1}). Conforme apresentado na Tabela 3, pode-se inferir que as concentrações de AT predominantes do LAS foram, em virtudes dos bicarbonatos e carbonatos, e ainda as concentrações de AT obtidas para o lixiviado, durante todo o período de monitoramento, encontram-se na faixa de teores determinados em aterros sanitários brasileiros (750 a 11.400 mg $\text{CaCO}_3\text{L}^{-1}$), de acordo com Souto e Povinelli (2007).

Segundo Libânio (2016), a alcalinidade é resultante da presença de hidróxidos (OH^-), carbonatos (CO_3^{2-}) e bicarbonatos (HCO_3^-), sendo estas espécies químicas, função do pH do meio. Diante disso, quando o pH apresenta-se na faixa entre 4,4 a 8,3 ocorre uma predominância

da alcalinidade apenas a bicarbonatos; enquanto que, em pH entre 8,3 e 9,4 a alcalinidade predominante é referente a presença de bicarbonatos e carbonatos; e quando o pH encontra-se acima de 9,4 a alcalinidade é devido a presença de hidróxidos e carbonatos.

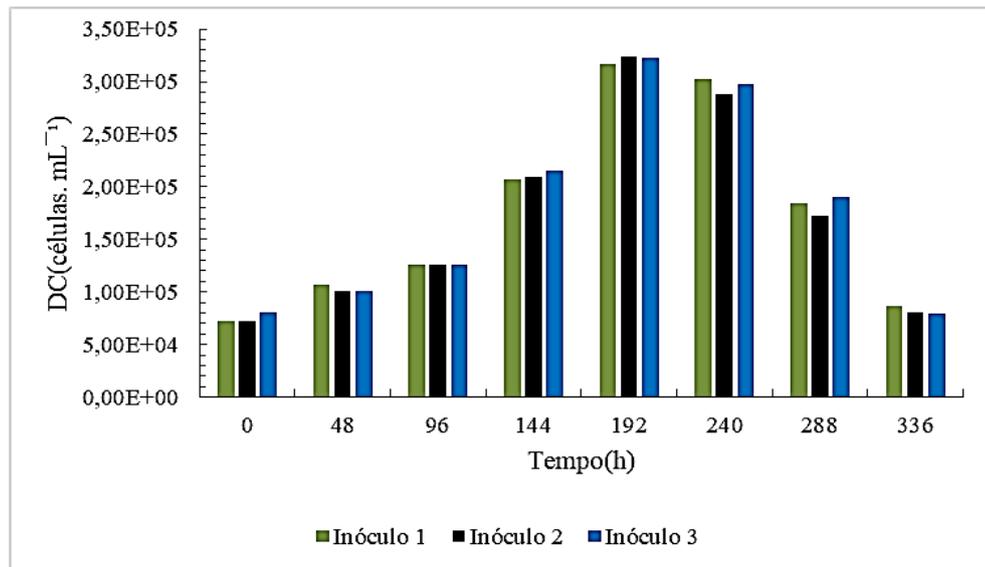
De acordo com os dados apresentados na Tabela 3, o lixiviado apresenta como principal forma de nitrogênio o N-amoniacal (2730 mg. L^{-1}) correspondendo assim a 98% de N_{total} , fornecendo nesta contextualização, um bom aporte de $N\text{-NH}_4^+$ para o crescimento das microalgas. Na concepção de Collos et al. (2014), a amônia ionizada parece ser a fonte ideal de N para as algas, uma vez que, seu estado de oxidação elimina a necessidade de sua redução, e, portanto, pode ser utilizado imediatamente para a síntese de aminoácidos.

Percebe-se que a magnitude de fósforo total presente no lixiviado e no esgoto doméstico pode ser assimilada pelas microalgas para a sintetização de ácidos nucleicos e ATP (adenosina Trifosfato). Segundo Ehrig (1983), o fósforo é um elemento fundamental aos processos energéticos dos seres vivos. Quanto aos valores de Ortofosfato, aproximadamente 76% do fósforo total presente no lixiviado é representado por esta fração solúvel. Corroborando com este resultado Souto (2009), afirma que, praticamente todo o fósforo encontrado em lixiviados está na forma de Ortofosfato, este proveniente principalmente da matéria orgânica em degradação.

3.3.2. Curva de Crescimento da *Chlorella* sp.

Ao analisar a curva de crescimento da *Chlorella* sp, verificou-se que ela apresentou fase Lag com duração aproximada de 1 dia, período em que ocorreu pouca ou nenhuma divisão celular pois estas se encontravam em estado de latência, decorrente da mudança das condições de cultivo. Nessa fase, a população algácea passa por um período de intensa atividade metabólica, síntese de enzimas e de moléculas variadas. A partir de 48h de monitoração foi registrado um incremento de 37,2% atingindo DC de $1,03 \times 10^5$ célula mL^{-1} . A maior densidade registrada foi $3,24 \times 10^5$ a 192h, representando um incremento de 431% em relação ao T_0 .

Os valores de pH foram sempre crescentes ao longo da monitoração nos 3 biorreatores, sendo identificado um incremento médio de 1,7 unidades. Este aumento é devido à redução do CO_2 no meio, como consequência da fotossíntese microalgácea. Os valores de cada ponto para os 3 inóculos estão apresentados na Figura 1.

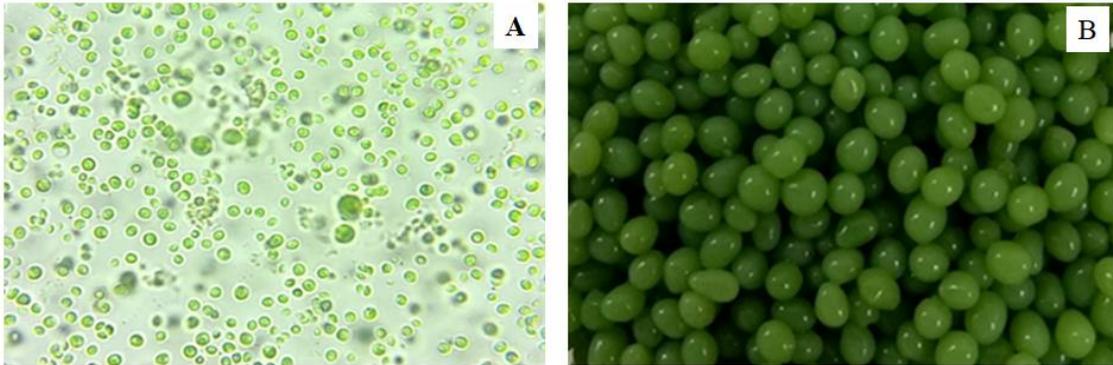
Figura 1. Curva de crescimento da *Chlorella* sp.

Fonte: Autora (2020)

Entre o 8^o e o 9^o dia, as culturas estavam em fase estacionária com densidade celular média de $3,21 \times 10^5$ sugerindo ser o melhor período para a imobilização. A partir de 240h, com pH crescente, identificou-se que a cultura se encontrava em fase de declínio, com densidade de $3,00 \times 10^5$ cél.mL⁻¹. Entre 288 e 336 h, foram identificados os maiores valores de pH, respectivamente 7,6 e 8,7(fase de declínio), associado a abundante quantidade de matéria orgânica nas amostras, a limitação de nutrientes e o acúmulo de metabólitos nocivos às células.

Resultado similar foi obtido por Przytocka-Jusiak et al. (1977) que identificaram no crescimento de *Chlorella vulgaris* em culturas contendo nitrogênio amoniacal era geralmente acompanhado com a mudança de pH, o meio tornou-se ácido em fase logarítmica de crescimento logarítmico variando para alcalina quando o as células estavam em fases estacionária e em declínio. Este resultado pode ser explicado, pois, estando as culturas em regime de batelada, havia a indisponibilidade de nutrientes no meio. Na Figura 2 está apresentada uma amostra da *Chlorella* sp. em fase estacionária (A) e Esferas de alginato de cálcio a 4% com a *Chlorella* sp. imobilizada.

Figura 2. (2-A) *Chlorella* sp. em fase estacionária, ampliação de 400x e (2-B) *Chlorella* sp. imobilizada em esferas alginato de cálcio a 4%.

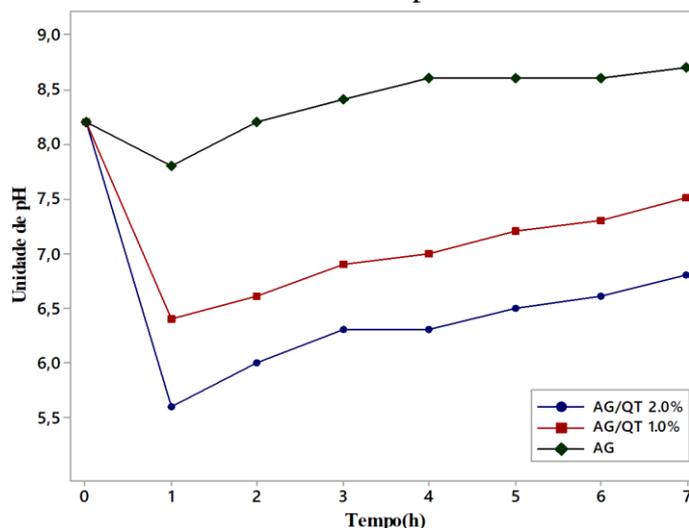


Fonte: Autora (2020)

3.3.3. Estudo do pH

O pH é um parâmetro importante na fitorremediação, uma vez que, para o tratamento da água residuária, a alga realiza fotossíntese assimilando CO_2 , elevando o pH do meio. O estudo do pH em diferentes matrizes imobilizantes indicou ser o alginato o polímero que menos interferiu na fisiologia da *Chlorella* sp. uma vez, que maiores incrementos de pH foram identificados em biorreator com alga imobilizada (BAI) em AG em comparação aos biorreatores com algas imobilizadas na blenda polimérica de AG/QT. Na Figura 3 está apresentado o comportamento temporal do pH em biorreatores com algas imobilizadas em diferentes matrizes poliméricas (AG/QT 2,0%; AG/QT 1,0% e AG).

Figura 3. Comportamento temporal do pH em sistemas com *Chlorella* sp. imobilizada em diferentes matrizes poliméricas



A análise do pH em biorreator alimentado por ED+LAS na proporção 19:1 e concentração afluyente de 260 mg.L^{-1} de nitrogênio amoniacal apresentando pH inicial de 8,2 apresentou redução na 1ª hora de monitoração, havendo uma recuperação a partir da 2ª hora com incrementos progressivos até a 7ª hora de monitoração. Este resultado é um indicativo de que houve atividade fotossintética por parte das algas. O aumento do pH pode ser explicado, pois, a fixação do dióxido de Carbono presente no efluente, por meio da fotossíntese das microalgas, proporciona uma maior dissociação de carbonato e bicarbonato. A dissociação faz com que a acidez carbônica seja removida do meio, ocorrendo, assim, a liberação de íons hidroxila (OH^-) acarretando um aumento do pH (MOTA e VON SPERLING, 2009; LI et al., 2011).

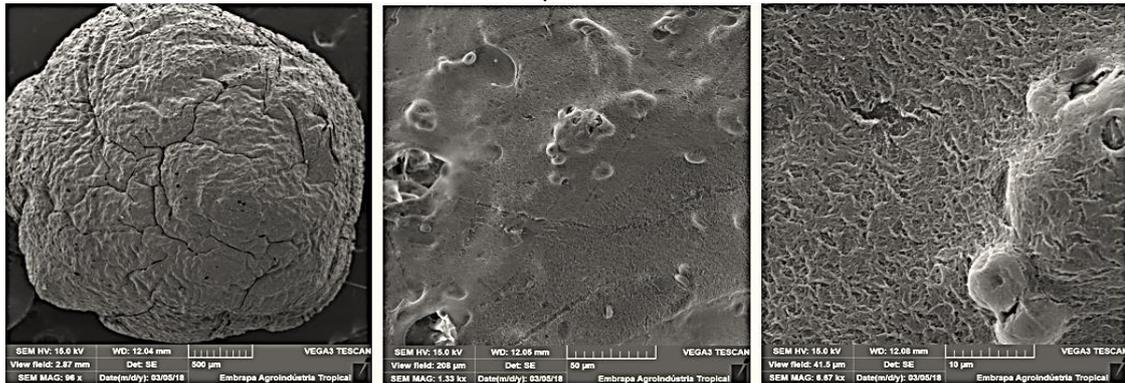
Nos biorreatores com *Chlorella* sp. imobilizada em esferas AG/QT, na 1ª hora de tempo de contato, identificou-se uma queda significativa no pH, provavelmente por conta da quitosana ser um polímero apenas solúvel em um ácido fraco, que neste caso foi usado o ácido acético P.A a 2,0 % e 1,0 % (v/v). Um dado que reforça esta hipótese foi que, os valores de pH foram sempre menores em algas imobilizadas em AG/QT a 2,0% durante cada hora de monitoração em relação ao biorreator em AG/QT a 1,0%.

3.3.4. MEV das esferas com algas imobilizadas

A eletromicrografia da superfície das esferas com *Chlorella* sp. imobilizada em AG/QT, revelou uma partícula com geometria esférica e estrutura compacta. Na concepção de Ribeiro et al. (2005), a forma esférica pode ser atribuída à alta taxa de reticulação ocorrida durante o processo de gelificação do alginato no cloreto de cálcio. A eletromicrografia apresenta raras células na superfície, isto indica que, a matriz garante a segurança da alga, a porosidade e o transporte de substâncias, ou seja, o encapsulamento produz uma formulação segura.

Corroborando com este resultado, Sian (1984), trabalhando com *Chlorella vulgaris* imobilizada em esferas de alginato na remoção de amônia apresentou resultados de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da estrutura interna da esfera, indicando que as células algáceas são revestidas pelo polímero. Na Figura 4 estão apresentadas as micrografias das esferas com algas imobilizadas em diferentes aumentos.

Figura 4. Micrografia da superfície de esfera com *Chlorella sp.* em aumentos de 500, 50 e 10 μm .



Fonte: Autora (2020)

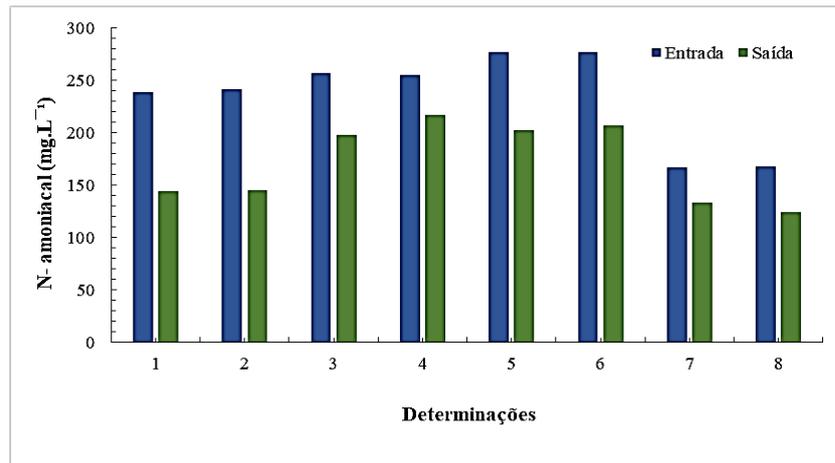
3.3.5. Etapa I - Remoção de N- amoniacal por *Chlorella sp.* imobilizada em esferas AG/QT

A remoção de nitrogênio amoniacal obtida em biorreatores com algas imobilizadas em AG/QT (1%), alimentados em batelada, TDH de 4 h e concentrações afluentes de nitrogênio amoniacal entre 167 e 277 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ manteve-se entre 15 e 40%, representando uma remoção de média 20 mg de N-amoniacal em 4 ensaios com 16h cumulativas de tempo de retenção celular, sendo a maior remoção, registrada no primeiro ensaio, com concentração média de 240 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de N-amoniacal.

Uma possível explicação para esse fenômeno é que, as algas imobilizadas podem tolerar concentrações relativamente altas de N-amoniacal devido à proteção do gel. Segundo Covarrubias et al. (2012), a célula imobilizada apresenta maior resistência à toxicidade, melhor estabilidade operacional e maior taxa de remoção de nutrientes, atestando assim, com estes resultados. Liu et al. (2019) defendem que as células das algas concentradas nas esferas de alginato de cálcio sofrem um grande aumento de densidade por unidade de volume e também podem desencadear interações, visando desta forma, melhorar a captação de N-amoniacal.

Em todos os ensaios foi registrada pequena queda no pH, pode este fato, estar relacionado com a remoção de N-NH_4^+ por microalgas em elevadas concentrações, sendo esta, a forma preferencial por microalgas, requerendo menor energia celular para a absorção metabólica. Na concepção de Jia & Yuan (2016) o N-amoniacal quando assimilado diretamente na via do aminoácido, ácido glutâmico, libera íons H^+ , o que pode reduzir o pH do meio. Na Figura 5 estão apresentados os valores de remoção de nitrogênio amoniacal em biorreatores com *Chlorella sp.* imobilizada em esferas AG/QT.

Figura 5. Remoção de Amônia em biorreatores AG/QT com TDH de 4 h.



Alguns estudos com microalgas registraram queda do pH. Khanzada & Övez (2018) cultivaram *Chlorella vulgaris* e *Chlamydomonas reinhardtii* no tratamento de lixiviado e identificaram que o pH estava constantemente diminuindo, atingindo 5,7. A redução do pH, também foi observado por Mustafa et al. (2012) no cultivo de algas em lagoas com alta taxa de N-amoniaco usando lixiviado a 4%.

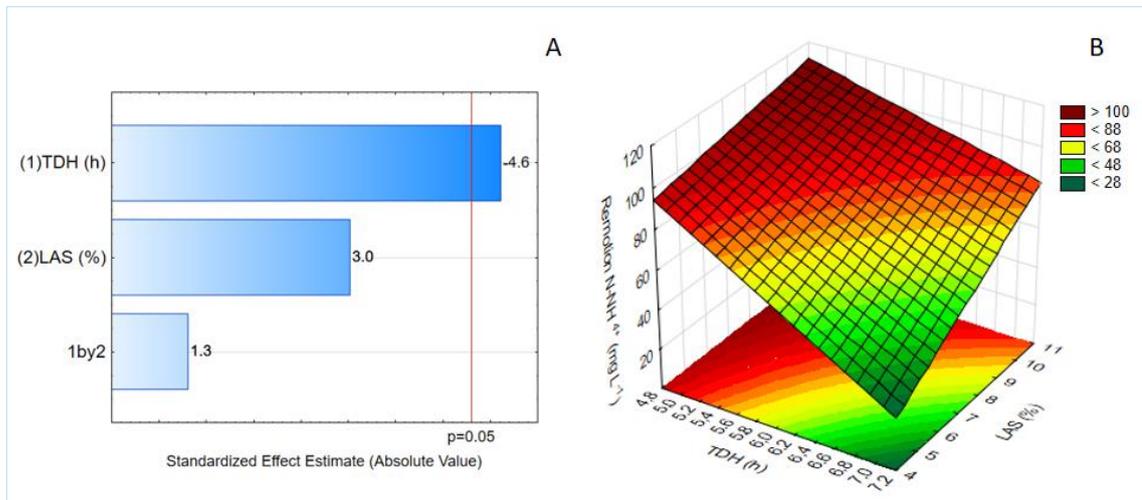
O resultado do planejamento fatorial, dados da ANOVA e do DOE 2⁽²⁻⁰⁾, visando a otimização do TDH e % de LAS no substrato para maximização da remoção de N-amoniaco por *Chlorella* sp. estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. ANOVA DOE 2⁽²⁻⁰⁾ com replicata do ponto central para o monitoramento de N-NH₄⁺.

| | SS | df | MS | F | p |
|------------------|----------|----|----------|----------|----------|
| 1 TDH (h) | 1640,250 | 1 | 1640,250 | 21,29043 | 0,043900 |
| 2 LAS (%) | 702,250 | 1 | 702,250 | 9,11520 | 0,094425 |
| By (2) | 132,250 | 1 | 132,250 | 1,71660 | 0,320387 |
| Error | 154,083 | 2 | 77,042 | | |
| Total SS | 2628,833 | 5 | | | |

A Figura 6 apresenta, respectivamente, o diagrama de Pareto e a Superfície de Resposta para o mesmo conjunto de dados.

Figure 6. Diagrama de Pareto e Superfície de resposta do DOE $2^{(2-0)}$ obtidos para o monitoramento de N-amoniaco.



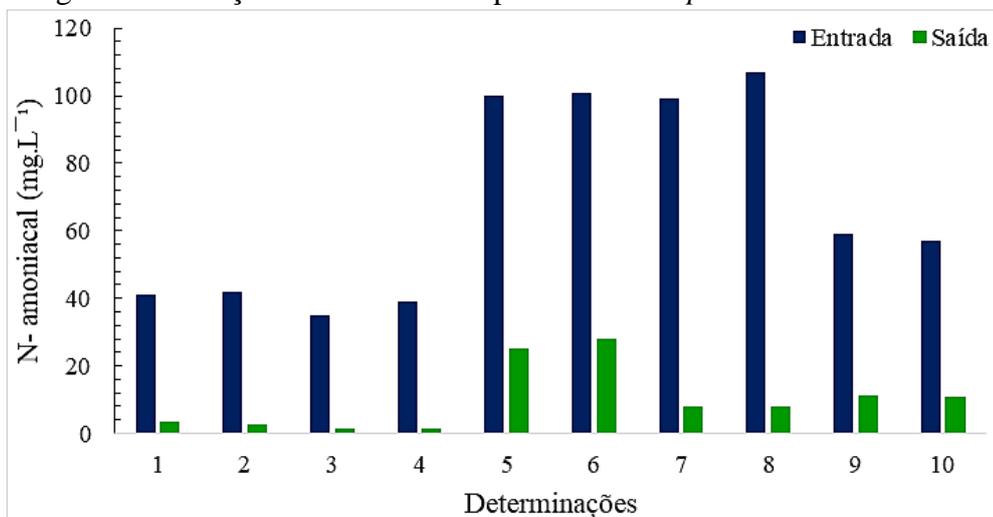
Conforme dados da ANOVA (Tabela 3) e diagrama de Pareto (Fig. 6-A), apenas o tempo exerceu influência estatística significativa sobre a remoção de N-NH_4^+ . Além disso, a interação entre variáveis dependentes (Tempo e % LAS) não exerceu influência sobre o parâmetro monitorado, explicando que, independentemente do nível de LAS, a relação estabelecida entre tempo e remoção de N-NH_4^+ segue o mesmo modelo matemático. Para nível confiança de 95% e R^2 0,94, o modelo matemático da superfície de resposta (Fig. 6-b) indica que, conforme o TDH aumenta, a remoção de N-NH_4^+ diminui. Apesar do teor LAS não exercer influência significativa sobre o parâmetro monitorado, a superfície de resposta indica que, conforme a concentração de LAS aumenta, a remoção de N-NH_4^+ é otimizada.

O resultado obtido a partir dos ensaios de remoção de N- amoniaco em TDH de 4 e 5h com concentrações afluentes médias respectivas de 273 e 281 mg.L^{-1} foi de aproximadamente 30% em TDH menor para 24% em TDH 5h. Este resultado, em relação ao TDH, é consistente com Whitton et al. (2018), que registraram em seu sistemas com microalgas clorofíceas imobilizadas em alginato de cálcio na remoção de nutrientes de efluente secundário, maior eficiência remoção de N-amoniaco em TDH de 3h.

3.3.6. Etapa II - Remoção de nitrogênio amoniacal de ED+LAS por *Chlorella sp.* imobilizada em esferas AG

Os resultados obtidos em TDH de 2h, para remoção de nitrogênio amoniacal, apresentaram uma mesma tendência, caracterizada por remoção média de 85,3% na primeira hora de contato em todas as concentrações afluentes testadas. No BAI, para 60% das amostragens foi identificada remoção mais significativa na 1ª hora em comparação com a 2ª hora de monitoração. No sistema controle (esferas de alginato a 4%), as remoções médias foram em torno de 28,7 %, sugerindo que a remoção também se dá pela via química. Na Figura 7 estão apresentados os resultados de remoção de N-amoniacoal no biorreator com *Chlorella sp.* imobilizada.

Figura 7. Remoção de N-amoniacoal por *Chlorella sp.* imobilizada em AG.



Na concepção de Klochenko et al. (2003), a tolerância de algas verdes a altas concentrações de íon amônio é que elas têm maior atividade do sistema GS/GDH e, portanto, o amônio é convertido rapidamente em aminoácidos, ao invés de ser acumulado na célula. Corroborando com este pensamento, Giordano et al. (2003), afirma que o amônio estimula a produção da PEPCase, enzima que promove rápida incorporação de amônio em compostos orgânicos, redução do amônio citosólico por várias vias de síntese e transporte deste, para o vacúolo onde é armazenado, visando evitar, toxicidade em algas.

- **Análise da influência da concentração inicial de N-amoniacoal e do TDH na remoção de N-amoniacoal**

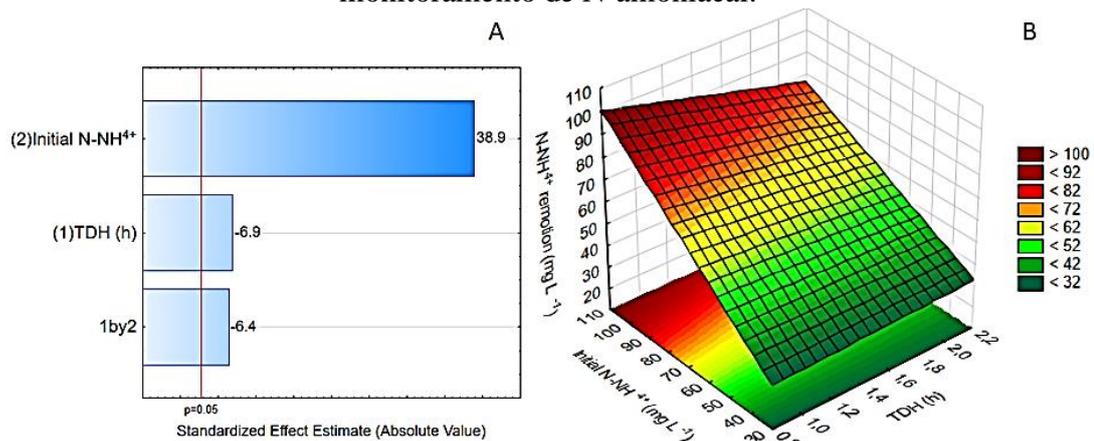
Na Tabela 5 estão apresentados os dados da ANOVA do DOE $2^{(2-0)}$ obtidos para o monitoramento de N-NH_4^+ . A Figura 8 apresenta, respectivamente, o diagrama de Pareto e a Superfície de Resposta para o mesmo conjunto de dados.

Tabela 5. ANOVA DOE $2^{(2-0)}$ com duas replicatas para o monitoramento de N-amoniacoal.

| | SS | df | MS | F | p |
|------------------|----------|----|----------|----------|----------|
| 1 TDH (h) | 114,534 | 1 | 114,534 | 47,527 | 0,002321 |
| 2 LAS (%) | 3649,570 | 1 | 3649,570 | 1514,431 | 0,000003 |
| By (2) | 98,912 | 1 | 98,912 | 41,045 | 0,003049 |
| Error | 9,639 | 4 | 2,410 | | |
| Total SS | 3872,655 | 7 | | | |

Conforme dados apresentados na ANOVA (Table 4) e no digrama de Pareto (Fig.8-A), tanto o TDH quanto a concentração inicial de N-NH_4^+ exerceram influência significativa na remoção final de N-NH_4^+ (F calculado $>$ que F tabelado e $p < 0,005$ para um limite 95% de confiança). De acordo com os valores de soma quadrática e dados do efeito padronizado, a concentração inicial de N-NH_4^+ exerce 5,6 vezes mais influência que o TDH sobre o parâmetro monitorado. Em adição, a interação entre TDH e N-NH_4^+ também foi significativa, indicando que o TDH exercerá um efeito diferente para cada nível de N-NH_4^+ afluyente. Na Figura 8: Diagrama de Pareto e a Superfície de Resposta para a monitoração da remoção de N- amoniacoal no sistema.

Figura 8. Diagrama de Pareto e Superfície de resposta do DOE $2^{(2-0)}$ obtidos para o monitoramento de N-amoniacoal.



Para um nível de confiança de 95% e R^2 0,997, o modelo matemático obtido para a superfície de resposta (Fig.8-B) indica que, em menor TDH, a remoção de $N-NH_4^+$ é otimizada. Ainda segundo este modelo, a remoção final de $N-NH_4^+$ foi maximizada conforme a concentração de entrada $N-NH_4^+$ aumentou. Este resultado explica que o equilíbrio bioquímico responsável pela metabolização de $N-NH_4^+$ em *Chlorella* sp. ainda possuía capacidade para receber concentrações maiores deste nutriente. Corroborando com este resultado, Collos & Harrison (2014), investigando a toxicidade do amônio em Chlorophyceas, identificaram que as concentrações de 129, 390 e 661 $mg.L^{-1}$, representavam respectivamente condições; ótima, inibitória e tóxica para as células.

3.3.7. Etapa III- Remoção de N-amoniaco de lixiviado de aterro sanitário por *Chlorella* sp. imobilizada em esfera AG

Nos experimentos tendo como substrato o LAS diluído em água destilada, foram registradas remoções de nitrogênio amoniacal que variaram entre 49 e 98% em TDH de 360 h. A maior eficiência foi registrada no biorreator com concentração afluente de N- amoniacal na faixa de 50 $mg.L^{-1}$, atingindo remoção quase completa de 98%. Hegggers e Yadavalli (2014) aplicando *Chlorella pyrenoidosa* imobilizada em alginato de cálcio, no tratamento de efluente lácteo, com TDH de 96h, obtiveram remoção de 98 e 98,5% respectivamente para PO_4^{3-} e $N-NH_4^+$.

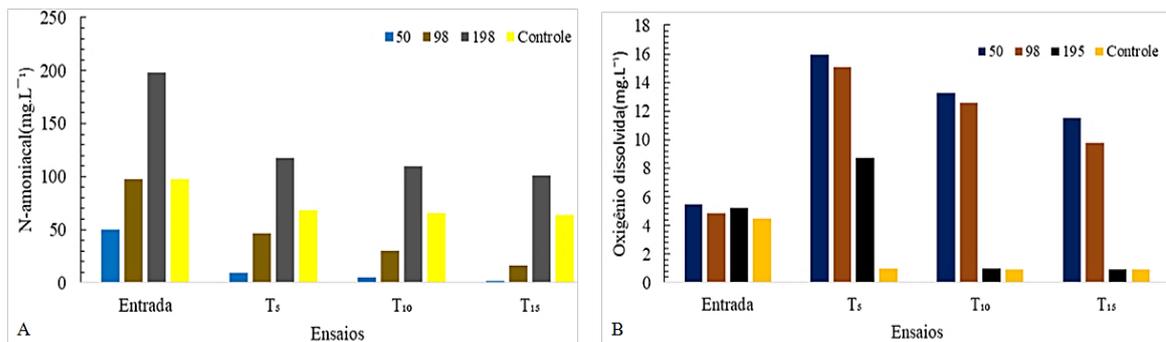
A eficiência das algas imobilizadas foi confirmada por Chen-Lin et al. (2017), que observaram maior eficiência de remoção de N-amoniaco por *Nannochloropsis* sp. imobilizada em alginato de cálcio (82,2%) do que em sistemas livres (47,3%) em TDH de 216 h.

O biorreator alimentado com 198 $mg.L^{-1}$ de nitrogênio amoniacal afluente, apresentou remoção de 48%. A baixa remoção pode estar associada à toxicidade de altas concentrações de amônio para a célula. A toxicidade do N-amoniaco foi demonstrada que ocorre mesmo em meio com pH tamponado, sugerindo que a toxicidade não está relacionada apenas a mudanças no pH externo e perturbação do pH citosólico induzida por amônio (BLIGNY et al., 1997). Britto e Kronzucker (2006) defendem que a natureza intensiva de energia do elevado movimento de NH_4^+ , alta taxa de ciclagem de íons através da membrana, é que desencadeia a toxicidade.

O menor desempenho observado foi no biorreator controle (esferas de AG), com remoções médias de 35% e concentração afluente de N- amoniacal média de 98 $mg.L^{-1}$. Foi registrado até o 5^o dia de monitoração, incremento de oxigênio dissolvido de aproximadamente

192, 211 e 67% respectivamente para os sistemas com concentrações de N-amoniaco afluentes de 50, 98 e 198 mg.L⁻¹. Este aumento pode ser explicado, considerando que, durante o processo fotossintético ocorre a fotólise da molécula de água no interior do tilacóide, com subsequente liberação do oxigênio pela microalga. Na Figura 9, os dados de remoção de N-amoniaco estão apresentados e incremento de oxigênio dissolvido nos diferentes tratamentos.

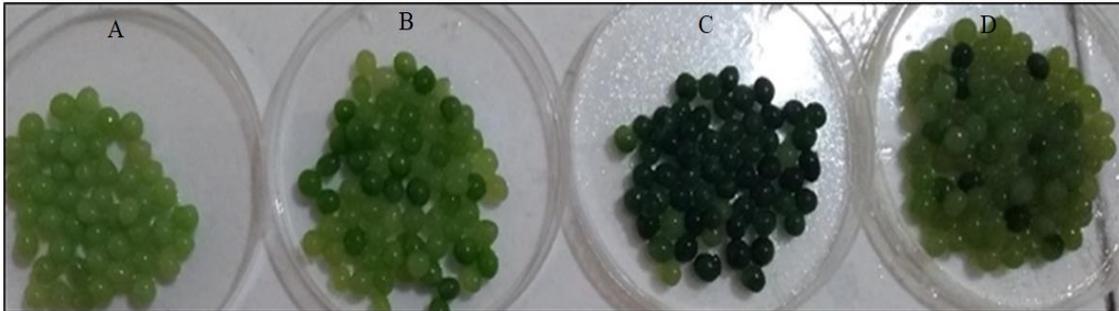
Figura 9. Comportamento temporal da remoção de N-amoniaco e síntese de oxigênio dissolvido nos diferentes tratamentos.



Fonte: Autora (2020)

Após 360h de monitoração, as esferas foram retiradas dos biorreatores e apresentaram coloração verde escura em comparação às esferas de entrada, sugerindo aumento de biomassa. Corroborando com este resultado, Liu et al. (2019), obtiveram aumento na síntese total de proteínas em *Scenedesmus obliquus* imobilizado em alginato de cálcio quando foi cultivado em águas residuárias ricas em NH₄⁺-N, atingindo valor de 566 mg.g⁻¹ em água residuária com 50 mg.L⁻¹ de NH₄⁺-N afluente. No presente trabalho, obiorreator com 98 mg.L⁻¹ de N-amoniaco afluente apresentou maior quantidade de esferas com a característica mencionada, sugerindo maior concentração de Clorofila *a*. Na Figura 10 estão apresentadas esferas com *Chlorella* sp. imobilizada de entrada e saída do sistema.

Figura 10: Esferas com algas imobilizadas: entrada/saída (50, 98 e 195 mg.L⁻¹ de N-amoniacal afluente)



Legenda:

- A- Esferas de entrada
- B- Esferas com tratamento em 50 mg.L⁻¹ de N- amoniacal
- C- Esferas com tratamento em 98 mg.L⁻¹ de N- amoniacal
- D- Esferas com tratamento em 198 mg.L⁻¹ de N- amoniacal

Os resultados obtidos neste trabalho, estão em concordância com Salama et al. (2017) que defendem que o nitrogênio(N) e o fósforo(P) são macronutrientes presentes em águas residuárias, assimilados para incorporação em moléculas básicas: proteínas, aminoácidos, DNA, RNA, ATP, lipídios e clorofilas.

A turbidez foi crescente em todos os sistemas, iniciando com 3,0; 4,5 e 8,0 NTU respectivamente para os sistemas de concentração de N-amoniacal afluente de 50, 98 e 198 mg.L⁻¹ apresentando ao final, valores respectivos de 70,0, 61 e 119 NTU. Estes valores podem ser explicados, uma vez que o fosfato presente no substrato atua como um quelante nas esferas de alginato de cálcio, promovendo a desestruturação na matriz e liberação de células para o substrato. Comparando os incrementos registrados no biorreator com algas imobilizadas e concentração afluente de 98mg.L⁻¹ e o controle, que recebeu substrato com igual concentração, o biorreator com *Chlorella* sp. imobilizada foi registrado um incremento na turbidez de 13,5 vezes para 30 vezes no controle.

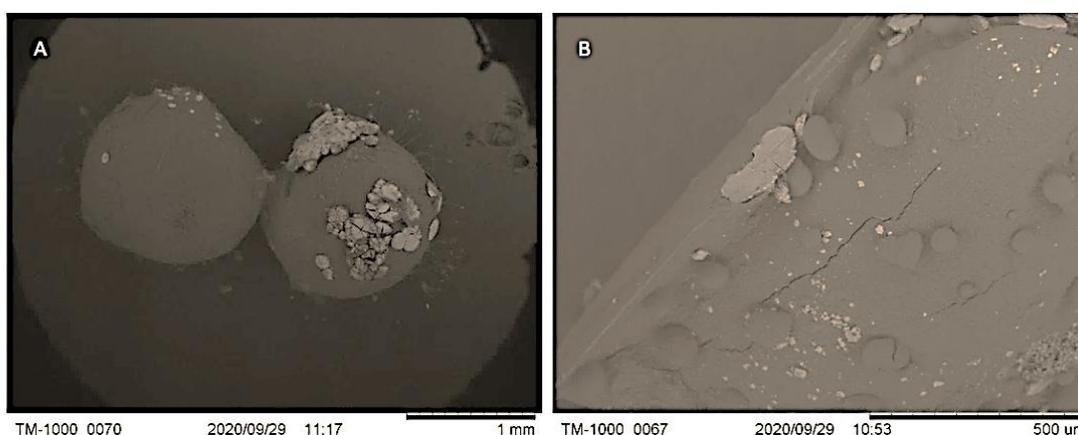
O pH monitorado em todos os sistemas se manteve na faixa de 7,2, favorecendo então, a predominância do NH₄⁺ em relação ao NH₃. O resultado deste parâmetro nos possibilita inferir que, o N-amoniacal removido não foi por *Stripping* de amônia, condição que ocorre em pH elevado, outrossim, pela assimilação microalgácea e por adsorção na matriz polimérica.

Avaliação da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS) das esferas produzidas

A análise de MEV das esferas com algas imobilizadas em AG constatou a presença de poros, possibilitando desta forma, o transporte de massa entre os meios externos e internos da esfera. Foi registrada a presença de células na superfície das esferas após a realização dos ensaios para todas as concentrações de N- amoniacal testada, fato este, não observado nas esferas antes do recheio do biorreator. Este resultado é consistente com Sian (1984) que em seus achados de MEV identificou que a *Chlorella vulgaris* ficava localizada no interior da esfera de alginato.

Os resultados de EDS (espectroscopia de raios X por dispersão em energia), das esferas antes do início do ensaio, indicaram a presença de carbono, oxigênio, cálcio e cloro. Nas esferas de saída para as concentrações de N- amoniacal testada foi identificada a presença de carbono, oxigênio, cálcio, alumínio, mercúrio, cloro, fósforo, silício e enxofre. Este fato pode ser explicado, uma vez que, com a assimilação de N- amoniacal, houve o aumento na densidade da *Chlorella* sp. Na Figura (11-A) está apresentada a análise de MEV da superfície externa de esferas com algas imobilizadas antes dos ensaios e (11-B) após o ensaio, apresentando células em sua superfície.

Figura 11. MEV de superfície de esferas com algas imobilizadas de entrada (aumento de 60x) e saída do sistema em aumento de 200x.



Fonte: Autora (2020)

3.4. CONCLUSÃO

Frente à análise dos dados deste trabalho, pode-se concluir que:

- A *Chlorella* sp. isolada do lixiviado de aterro sanitário, apresentou rápida aclimação ao meio de cultura MBB, atingindo a fase estacionária a 192h de cultivo, sendo este o período mais apropriado ao procedimento de imobilização celular;
- A Quitosana diluída em ácido acético a 2% provocou redução no pH do sistema de aproximadamente 2,6 unidades em 1 hora de tempo de contato, sugerindo comprometimento no metabolismo algáceo, desta forma, inviabilizando sua aplicação na imobilização celular;
- A imobilização celular é uma tecnologia eficiente de proteção e retenção da célula no reator, uma vez que, o alginato apresentou, através da análise de MEV e EDS, ser uma matriz com porosidade e resistência aos componentes do lixiviado em diluição a 7,3%, que manteve as células aprisionadas no interior da esfera, podendo ser aplicadas em outros ensaios;
- A *Chlorella* sp. imobilizada em alginato de cálcio apresentou eficiência de remoção de N-amoniaco de LAS diluído em esgoto doméstico para todas as faixas testadas (41 a 107 mg.L⁻¹), sendo registradas remoções entre 81 e 97% em TDH de 2h, ratificando sobremaneira, o grande potencial das microalgas na recuperação material nitrogenado de águas, mitigando desta forma a problemática da eutrofização dos mananciais;
- A *Chlorella* sp. apresentou eficiência de remoção de N-amoniaco de LAS diluído em água destilada na faixa de 49 a 98% em um período de 336h de monitoração, com incorporação de massa de nitrogênio por sistema entre 9,8 e 19,4 mg. Os resultados dessa pesquisa apontam para o potencial de aplicação da *Chlorella* sp. imobilizada no tratamento de lixiviados, removendo o N-amoniaco que sabidamente, é o contaminante que dificulta o tratamento biológico deste resíduo líquido.

REFERÊNCIAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION -APHA, AWWA, WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22th ed. **Washington, D.C.** 2012.

BAKRAOUY, H.; SOUABI, S.; DIGUA, K. Optimization of the treatment of an anaerobic pretreated landfill leachate by coagulation–flocculation process using experimental design methodology. **Process Safety and Environment Protection**, v. 109, p. 621–630, 2017.

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

BLANK, C, E.; PARKS, R, W.; HINMAN, N. W. “Chitin: a potential new alternative nitrogen source for the tertiary, algal-based treatment of pulp and paper mill wastewater, **Journal of Applied Phycology**, p. 1–14, 2016.

BLIGNY, R.; GOUT, E.; KAISER, W.; HEBER, U.; WALKER, D.; DOUCE, R. pH regulation in acid-stressed leaves of pea plants grown in the presences of nitrate of ammonium salts: studies involving p-NMR spectroscopy and chlorophyll fluorescence. **Biochim. Biophys. Acta**. v. 1320, p. 145- 152, 1997.

BOROWITZKA, M. A. Microalgal biotechnology cambridge. **University Press. Cambridge**, 1988.

BRITTO, D. T.; J. KRONZUCKER. Futile cycling at the plasma membrane a hallmark low-affinity nutrient transport. **Trends Plant Sci.** v. 11, p. 529-534. 2006.

CHEN-LIN, S.; CHENG-ANN C.; OTHMAN B.; YII-SIANG, H. Feasibility of marine microalgae immobilization in alginate bead for marine water treatment: bead stability, cell growth, and ammonia removal. **Hindawi International Journal of Polymer Science**, v.7, p 1-7, 2017.

COLLOS, Y & HARRISON, P.J. Acclimation and toxicity of high ammonium concentrations to unicellular algae. **Elsevier. Marine Pollution Bulletin**, v.80, p. 8-23, 2014.

COVARRUBIAS, S. A.; DE-BASHAN, L. E.; MORENO, M.; BASHAN, Y. Alginate beads provide a beneficial physical barrier against native microorganisms in wastewater treated with immobilized bacteria and microalgae, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 6, p. 2669–2680, 2012.

CUELLAR-BERMUDEZ, S.P.; ALEMAN-NAVA, G.S.; CHANDRA, R.; GARCIA-PEREZ, J.S.; CONTRERAS-ANGULO, J.R.; MARKOU. G.; MUYLEAERT, K.; RITTMANN, B.E.; PARRA-SALDIVAR, R. Nutrients utilization and contaminants removal. A review of two approaches of algal and cyanobacteria in wastewater. **Algal Research**. v. 24, p. 438-449, 2017.

EHRIG, H. J. Quality and quantity of sanitary landfill leachate. **Waste Management & Research**, v.1, p. 53 – 68, 1983.

- FIERRO, S.; DEL PILAR SÁNCHEZ-SAAVEDRA, M.; COPALCÚA, C. “Nitrate and phosphate removal by chitosan immobilized *Scenedesmus*,” **Bioresource Technology**, v. 99, n. 5, p.1274–1279, 2008.
- FILIPPINO, K, C.; MULHOLLAND, M. R.; BOTT, C.B. Phycoremediation strategies for rapid tertiary nutrient removal in waste stream. **Algal Research**, v. 11, p. 125-133, 2015.
- GARCIA. L.M.; GARIÉPY. Y; BARNABE. S.; RAGHAVAN. V. Biorefinery of microalgae biomass cultivated in wastewaters. **Science Direct**. v. 7, p.149-180, 2020.
- GIORDANO, M.; NORICI, A.; FORSSEN, M.; ERIKSSON, M.; RAVEN, J.A. An anaplerotic role for mitochondrial carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Physiol**. v. 132, p. 2126–2134, 2003.
- GUERRERO III, R.D & VILLEGAS, C.T. Report of the training course on growing food organism for fish hatcheries. Philippines, **South China Sea Fisheries Development/Coordinating Programam-** 1982.
- HEGGERS, G.R.V.N.; YADAVALLI, R. Two stage treatment of dairy effluent using immobilized *Chlorella pyrenoidosa*. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**. v. 11, p. 11-36, 2014.
- JIA, H & YUAN, Q. Removal of nitrogen from wastewater using microalgae and microalgae–bacteria consortia, **Cogent Environmental Science**, v.2, p. 1-15, 2016.
- KAS, H. S. Chitosan: properties, preparation and application to microparticulate coupled with wastewater treatment for biofuel generation. Renewable and Sustainable. **J. Microencapsul.**, v. 14, n. 6, p. 689-711, 1997.
- KHANZADA, Z.T and ÖVEZ, S. Growing fresh water microalgae in high ammonium landfill leachate. **American Journal of Mechanics and Applications**. v. 6, p. 50-61, 2018.
- KLOCHENKO, P.D.; GRUBINKO, V.V.; GUMENYUK, G.B.; ARSAN, O.M. Peculiarities of ammonium nitrogen assimilation in green and blue-green algae. **Hydrobiol. J.**, v.39, p. 102–108, 2003.
- LEITE, V.D.; OLIVEIRA, A.G.; CAMPOS, A.R.C.; SOUSA, J.T.; LOPES, W.S.; OLIVEIRA, E.G. Tratamento conjugado de lixiviado de aterro sanitário e esgoto doméstico em lagoas de estabilização. **Revista DAE**, p. 77-93, 2017.
- LI, Y.; CHEN, Y. F.; CHEN, P.; MIN, M.; ZHOU, W.; MARTINEZ, B.; ZHU, J.; RUAN, R. Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 5138–5144, 2011.
- LIBÂNIO, M. Fundamentos de qualidade e tratamento de água. Campinas. SP: **Editora Átomo**, 4ª ed., 550p, 2016.
- LIU.X. WANG.K.; ZHANG. J.; WANG.J. WU. J.; PENG. F. Ammonium removal potential and its conversion pathways by free and immobilized *Scenedesmus obliquus* from wastewater. **Bioresource technology**, v. 283, p. 184-190, 2019.

LU, Y.; XU, S.; JIANG, Z.; YUAN, W.; WANG, T. Diffusion of nicotinamide adenine dinucleotide in calcium alginate hydrogel beads doped with carbon and silica nanotubes. **Journal. Chem. Eng. Data.** v. 50, p. 1319-1323, 2005.

MOJIRI, A.; ZIYANG, L.; HUI, W.; AHMAD, Z.; TAJUDDIN, R.M.; ABU, S.S.; KINDAICHI, T.; AZIZ, H.A.; FARRAJI, H. Concentrated landfill leachate treatment with a combined system including electro-ozonation and composite adsorbent augmented sequencing batch reactor process, **Process Saf. Environ.**, v. 111, p. 253–262, 2017.

MOTA, F. S. B.; VON SPERLING, M. (Org.). Nutrientes de Esgoto Sanitário: utilização e remoção. Rio de Janeiro: **ABES**, 428p. ,2009.

MUSTAFA, E.M.; PHANG, S.M.; CHU, W.L. Use of algal consortium of five algae in the treatment of landfill leachate using the high-rate algal pond system. **J. Appl. Phycol.**, v. 24, p. 953-963, 2012.

MUJTABA, G.; RIZWAN, M.; LEE, K. Removal of nutrients and COD from wastewater using symbiotic co-culture of bacterium *Pseudomonas putida* and immobilized microalgae *Chlorella vulgaris*. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry. ELSEVIER**, v.49, p. 145- 15, 2017.

PEARSON, H.W.; MARCON, A.E.; MELO, H.N. The removal of thermo-tolerant coliform bacteria by immobilized waste stabilization pond algae. **Water Science & Technology**, v.63, p. 1271-1275, 2011.

PENG, Y. Perspectives on technology for landfill leachate treatment. **Arabian Journal of Chemistry**, 2013.

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**, v. 2, cap. 16, p. 355-372, 2001.

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

RENDRA, S.; WARITH, M. A.; FERNANDES, L. Degradation of municipal solid waste in aerobic bioreactor landfills. **Environmental Technology**, v. 28, p. 609–620, 2007.

RIBEIRO, A.J.; SILVA, C.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Chitosan-reinforced alginate microspheres obtained through the emulsification/internal gelation technique. **European Journal of Pharmaceutical Science.** v. 25, p. 31-40, 2005.

SALAMA, E. S.; HURADE, M. B.; ABOU-SHANAB, R. A.I.; EL-DALATONY, M. M.; YANG, I. S.; MIN, B.; JEON, B. H. Recent progress in microalgae biomass production systems energy reviews, v. 79, p. 1189-1211, 2017.

- 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, M.C.C.P. Tratamento terciário de efluente secundário, usando a microalga *Chlorella* sp. Imobilizada em matriz de alginato de cálcio. 81p. Dissertação de mestrado. **Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental.UEPB**, Campina grande, 2011.
- SILVA, M.C.C.P, LEITE, V.D, SOUSA, J.T. PEARSON, H.W. Remoção de nutrientes de efluente secundário oriundo de filtro de areia usando a microalga *Chlorella* sp. imobilizada em matriz de alginato de cálcio. **9º Encontro Internacional das Águas, Universidade Católica de Pernambuco**, 2017.
- SILVA, M, C, C, P.; LEITE, V, D.; ALBUQUERQUE, M, V, C.; SILVA JUNIOR, J. F. Tratamento de lixiviado de aterro sanitário aplicando microalgas em meio não suplementado de nutrientes. **Terra – Habitats Urbanos e Rurais**. p.1398-1409, 2018.
- SOUTO, B. A. G. Lixiviados de aterros sanitários brasileiros – estudo de remoção do nitrogênio amoniacal por processo de arraste com ar (“stripping”). 371 p. Tese de Doutorado (**Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento**), **Universidade de São Paulo**, São Carlos, 2009.
- SOUTO, G. D. B.; POVINELLI, J. Características do lixiviado de aterros sanitários no Brasil. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Belo Horizonte. **Anais. ABES**, p. 1-7, 2007.
- TAKEDA, H. Classification of *Chlorella* strains by cell wall sugar composition **Phytochemistry**, v. 27, p. 3823- 3826, 1988.
- TAVARES, L. H. S.; ROCHA. O. Produção de Plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para Alimentação de Organismos Aquáticos. São Carlos. **Rima**, 105p, 2003.
- THANOO, B.C.; SUNNY, M.C.; JAYAKHRISHNAN, A. cross-linked chitosan microsferes: preparation and evaluation as a matrix for the controlled release of pharmaceuticals. **Journal of Farmacy and Farmacology**. London, v 44, n^o 4, p.283-286, 1992.
- VALDEZ, C; PERENGUEZ, Y; MATYAS, B; GUEVARA, M,F; Analysis of removal of cadmium by action of immobilized *Chlorella* sp. microalgae in alginate beads. **Research-Open for Science**, v. 7, p. 1-8, 2018.
- WANG, L.; RIDGWAY, D.; GU, T.; MOO-YOUNG, M. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. **Biotechnology Advances**, v. 23, n 2, p. 115-129, 2005.
- WHITTON, R.; SANTINELLI, M.; PIDOU,M.; OMETTO,F.; HENDERSON,R.; RODDICK, F.; JARVIS, P.; VILLA, R.; JEFFERSON, B. Tertiary nutrient removal from wastewater nutrient characteristics and hydraulic retention time (TRH). **IWA PUBLISHING, Open Journal**, v. 1, n.1, p.12-25, 2018.

YAZDANI, M.; MONAVARI, S. M.; OMRANI, G. A.; SHARIAT, M.; HOSSEINI, S. M. Landfill sites suitability assessment by means of geographic information system analysis. **Solid Earth**, v. 6, p. 945–956, 2015.

ZHOU, W.; CHEN, P.; MIN, M.; MA, X.; WANG, J.; GRIFFITH, R. Environment-enhancing algal biofuel production using wastewater. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 36, p. 256–269, 2014.

CAPÍTULO 4

REMOÇÃO DE NITROGÊNIO AMONÍACO DE LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO POR *Chlorella* sp. EM SISTEMAS ALIMENTADOS EM REGIME DE BATELADA.

RESUMO

Neste estudo foi avaliado o crescimento da *Chlorella* sp. em diferentes diluições de lixiviado de aterro sanitário(LAS). O lixiviado é resultante da degradação dos resíduos e da água que percola na camada de cobertura e interior das células de aterramento. Apresenta elevada carga de poluentes recalcitrantes, altos níveis de nitrogênio amoniacal, metais pesados, matéria orgânica e fósforo, podendo ser aplicado na produção de biomassa algal. O estudo foi desenvolvido em 3 etapas com sistemas alimentados em regime de batelada. Na etapa I, o sistema constituiu-se de 4 biorreatores com substrato em volume de 100 mL, fotoperíodo de 24 horas, temperatura de 27° C, TDH de 168 horas e concentrações de N- amoniacal afluyente de 47, 99, 198 e 385 mg.L⁻¹. Na etapa II foram monitorados 7 biorreatores alimentados com lixiviado in natura foi diluído em água destilada em diferentes percentuais (10, 20, 30, 40, 50 e 100%), tendo MBB como controle positivo. Cada biorreator foi alimentado com 500mL de substrato e 10 mL de cultivo de *Chlorella* sp. em fase estacionária, densidade celular de 5,47×10⁴ cel. mL⁻¹, TDH de 336h, amostragens de 50 mL a cada 48h para avaliação do pH, oxigênio dissolvido, turbidez, nitrogênio amoniacal e contagem de células. Na etapa III, foram monitorados 3 biorreatores com os seguintes substratos; i) lixiviado submetido a *Stripping* de amônia, ii) LAS diluído em água destilada e iii) MBB+ NH₄Cl apresentando concentrações de N-amoniacal afluentes respectivas de 6, 100 e 140 mg.L⁻¹, o volume de substrato de alimentação foi 1000 mL, inoculados com 50 mL de meio de cultivo. Os ensaios foram conduzidos em triplicata. A análise estatística dos dados foi realizada através de um planejamento full fatorial de três níveis Box-Behnken 3⁽²⁻⁰⁾ design (BBD) combinada com a metodologia de superfície de resposta e (ANOVA), através dos softwares Microsoft Excel 2013, Statistic 8,0 e Minitab 17. Foi registrado crescimento celular em todos os tratamentos, com remoções de N- amoniacal variando entre 6 e 59%, e incrementos celulares variando entre 27 e 178% até 96h de monitoração. Na etapa III foram obtidas remoções de nitrogênio amoniacal de 100, 49 e 20% respectivamente para os tratamentos de lixiviado que foi tratado por *Stripping*, lixiviado diluído a 100 mg.L⁻¹ e MBB+NH₄Cl. Neste último tratamento não foram verificados incrementos de pH e de oxigênio dissolvido. Os resultados obtidos neste trabalho são indicativos de que a *Chlorella* sp. consegue crescer em lixiviado, podendo ser aplicada no tratamento de LAS.

Palavras-chave: Crescimento celular; Toxicidade; Chorume; Nutrientes.

ABSTRACT

In this study, the growth of *Chlorella* sp. in different dilutions of landfill leachate. Leachate is the result of the degradation of wastewater that seeps into the covering layer and the interior of the earthing cells. It has a high load of recalcitrant pollutants, high levels of ammoniacal nitrogen, heavy metals, organic matter and phosphorus, and can be applied in the production of algal biomass. The study was developed in 3 stages with systems fed in batch mode. In step I, the system consisted of 4 bioreactors with substrate in 100 mL volume, 24-hour photoperiod, 27° C temperature, 168-hour HRT and affluent N-ammoniacal concentrations of 47, 99, 198 and 385 mg. L⁻¹. In step II, 7 bioreactors fed with leachate *in natura* were monitored and diluted in distilled water in different percentages (10, 20, 30, 40, 50 and 100%), with MBB as a positive control. Each bioreactor was fed 500mL of substrate and 10 mL of *Chlorella* sp. in stationary phase, cell density of 5.47×10^4 cel. mL⁻¹, 336h TDH, 50 mL sampling every 48h to evaluate pH, dissolved oxygen, turbidity, ammonia nitrogen and cell count. In step III, 3 bioreactors fed with leachate subjected to stripping, leachate diluted in distilled water and MBB + NH₄Cl with respective affluent N-ammoniacal concentrations of 6, 100 and 140 mg.L⁻¹ were monitored, the volume of feed substrate was monitored. 1000 mL, inoculated with 50 mL of culture medium. The tests were conducted in triplicate. The statistical analysis of the data was carried out through a full factorial planning of three levels Box-Behnken 3⁽²⁻⁰⁾ design (BBD) combined with the response surface methodology and (ANOVA), using Microsoft Excel 2013, Statistic software 8.0 and Minitab 17. Cell growth was recorded in all treatments, with N-ammonia removals ranging from 6 to 59%, with cell increments ranging from 27 to 178% up to 96h of monitoring. In step III, ammonia nitrogen removals of 100, 49 and 20% were registered respectively for the Leachate treatments that were treated by Stripping, leachate diluted to 100 mL.L⁻¹ and MBB + NH₄Cl. In this last treatment, there were no increases in pH and dissolved oxygen. The results obtained are indicative that *Chlorella* sp. it can adapt and grow in different leachate dilutions, and can be applied in the treatment of landfill leachate.

Keywords: Cell growth; Toxicity; Slurry; Nutrients.

4.1. INTRODUÇÃO

O aterro sanitário é o método mais adequado de disposição de resíduos sólidos urbanos (RSU) nos países em desenvolvimento, devido aos baixos custos e a simples operação (ABOOD et al., 2014). Uma implicação, é que, a degradação química dos resíduos aterrados, associada à precipitação gera uma quantidade substancial de lixiviado, água residuária com ampla variedade de contaminantes (MOJIRI et al., 2017). O lixiviado de aterro geralmente compreende alta concentração de compostos orgânicos e inorgânicos dissolvidos, amônia e compostos orgânicos xenobióticos (COX), que são altamente tóxicos para os organismos vivos e o meio ambiente (KJELDSEN et al., 2002). Apresenta baixa relação C/N, bem como significativas concentrações de metais pesados tóxicos (OULEGO et al., 2016).

A presença de todos estes componentes dificultam o tratamento da água residuária. No entanto, o uso potencial das microalgas para tratar lixiviado, denominado fitorremediação, tem sido avaliado de maneira satisfatória, embora menor grau comparado ao número de estudos que avaliaram o tratamento de águas residuárias domésticas. O elevado teor de nutrientes e maior custo de tratamento do lixiviado, em comparação com as águas residuárias domésticas, justifica o investimento em pesquisas desta natureza (EDMUNDSON & WILKIE, 2013).

Assimilação de nutrientes por algas, especificamente nitrogênio e fósforo, seria altamente benéfico, já que a remoção de nutrientes das águas residuárias é processo caro em instalações de tratamento de água bruta, custando aproximadamente US\$ 4,4/ kg-nitrogênio e 3\$ 3,05/kg-fósforo para remoção (RAWAT et al., 2013).

O principal desafio de pesquisas no tratamento de lixiviados com algas é o alto teor de nitrogênio amoniacal do lixiviado. A amônia é a fonte preferida de nitrogênio para muitas espécies de algas, mas altas concentrações podem ter efeitos tóxicos nas algas. O lixiviado deverá ser diluído em água destilada ou águas residuárias, a fim de reduzir a concentração de amônia para uma concentração não-inibitória. (MUNOZ & GUIEYSSE, 2006; PAVASANT et al., 2006).

El Ouaer et al. (2017), obtiveram remoção de 90% de NH_4^+ (forma ionizada) com *Chlorella* sp. em lixiviado diluído a 10% em MBB. Paskualikova et al. (2016), registraram 90% de remoção de N- amoniacal por *Chlamydomonas* sp. a partir de 10% de lixiviado bruto diluído em água deionizada com TDH de 30 dias de cultivo. Zhao et al. (2014), investigaram lixiviado

de aterro sanitário diluído com esgoto doméstico em diferentes proporções e observaram 90% de remoção total de nitrogênio.

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo, investigar qual a concentração de N-amoniaco de lixiviado de aterro sanitário mais adequada do ponto de vista fisiológico para o crescimento da *Chlorella* sp. e para a remoção de nitrogênio amoniaco em sistemas livres alimentados em regime de batelada.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Considerações Gerais

A pesquisa foi realizada nas dependências físicas da Estação Experimental de Tratamentos Biológicos de Esgotos Sanitários (EXTRABES), pertencente à Universidade Estadual da Paraíba, situada no bairro do Tambor, na cidade de Campina Grande – PB. O LAS (Lixiviado de Aterro Sanitário) estudado, foi coletado na entrada da lagoa de decantação do sistema de lagoas de tratamento de lixiviado de Aterro Sanitário Metropolitano de João Pessoa (ASMJP)– PB, (7°13'00" S e 34° 57'11" W), transportado em reservatórios de polietileno de 50L até as dependências da EXTRABES, para subsequente caracterização físico-química. Antes de cada amostragem para fracionamento e análise, os recipientes com lixiviado foram agitados para homogeneizar o conteúdo e ressuspender as partículas decantadas e reinserção do nitrogênio amoniaco livre ao resíduo líquido.

4.2.2. Identificação do Fitoplâncton

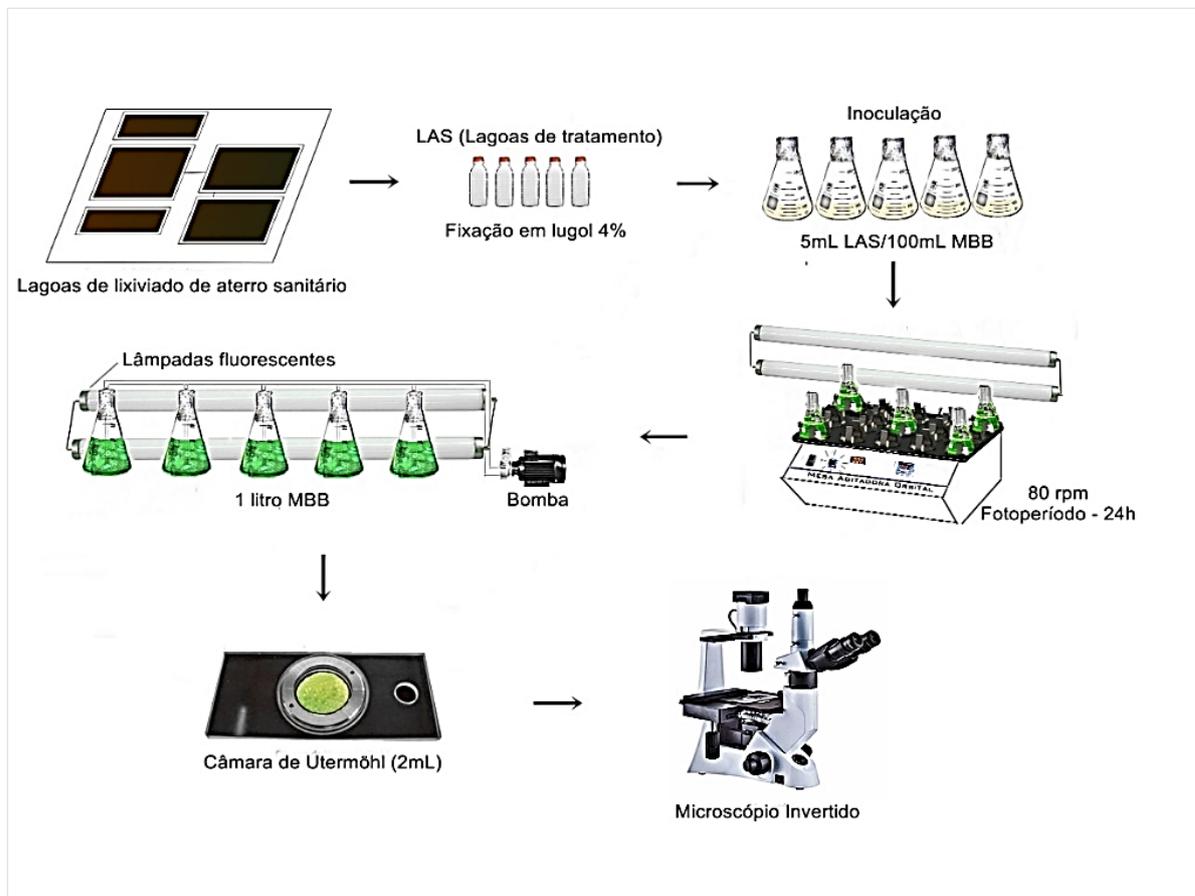
Para identificação do fitoplâncton, 5 mL de LAS (2,5mL afluentes e 2,5 efluentes de cada lagoa) foram transportados para cinco frascos erlenmeyers de 250 mL, contendo cada um, 100 mL de meio ASM-1 estéril, (GORHAM et al. 1964 & ZAGATTO e ARAGÃO, 1992). As amostras foram colocadas em mesa rotatória com rotação 80 rpm, temperatura de 30° C e fotoperíodo de 24 horas. Transcorrido o período de 14 dias, procedeu-se a identificação do fitoplâncton, utilizando microscópio com lente de aumento de 400 vezes. O sistema de classificação para classes e gêneros seguiu recomendações de Bicudo e Menezes (2006), e, para as espécies foram utilizadas chaves de identificação específicas de cada grupo. A contagem do

fitoplâncton foi realizada por câmara de Utermöhl capacidade de 2 ml da marca CIENLAB, pelo método da sedimentação de Utermöhl (1958).

4.2.3. Isolamento e Cultivo

O isolamento da *Chlorella* sp. foi realizado pelo método de ágar em placa preconizado por Guerrero III e Villegas (1982). As cepas de *Chlorella* sp. foram inoculadas em placas de Petri, pré-esterilizadas contendo Meio Basal Bold's-MBB (BISCHOFF & BOLD, 1963; BOROWITZKA, 1988) com 1,5% de ágar. Na Figura 1 apresenta-se um diagrama esquemático desde a coleta até identificação das espécies integrantes do fitoplâncton.

Figura 1. Etapas sequenciais da coleta do LAS até a identificação do fitoplâncton.



Fonte: Autora (2020)

As amostras foram mantidas em câmara de cultivo com temperatura de 27° C em fotoperíodo de 24 horas, sob iluminação de 4 lâmpadas fluorescentes, intensidade de fótons de

85 $\mu\text{E}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$. Após 21 dias, foi realizado o isolamento usando pipeta de Pasteur. A observação do gênero algal foi procedida em microscópios Invertido NIB-100 INF e óptico Binocular N 107 da marca Coleman em objetiva de 400x, sendo essa cepa unialgal dominante na amostra, inoculada em frascos erlenmeyers contendo 50 ml de MBB. Aos 21 dias, as microalgas foram inoculadas em 100 mL de MBB e colocadas na mesa rotatória com 80 rev. min^{-1} em frascos erlenmeyer de 250 mL. Passados 7 dias, 32 mL de meio de cultivo foram ressuspensos em 6 frascos erlenmeyer de 2L contendo cada um, 1600mL MBB, conectados a uma bomba marca BOYUC, com vazão de ar por biorreator: 0,16 L. min^{-1} .

4.2.4. Reagentes

Para o preparo dos meios de cultivo do fitoplâncton foram utilizados os seguintes componentes químicos:

O meio ASM-1 estéril foi preparado com as seguintes soluções reagentes: NaNO_3 (8,5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2,45 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) $\text{MgCl}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$ (2,05 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,45 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), KH_2PO_4 (8,7 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (17,8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), H_3BO_3 (28,40 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (13,9 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10,8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), ZnCl_2 (3,35 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,1900, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,0140 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), EDTA titriplex (18,6 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Para cada solução estoque os compostos foram diluídos em 1.000 mL de água deionizada e armazenados no freezer em frascos plásticos.

O Meio Basal de Bolds (BBM) para cultivo de *Chlorella* sp. foi composto de NaNO_3 (250 mg L^{-1}), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (75 mg L^{-1}), NaCl (25 mg L^{-1}), K_2HPO_4 (75 mg L^{-1}), KH_2PO_4 (175 mg L^{-1}), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (25 mg L^{-1}), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (8,82 mg L^{-1}), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1,44 mg L^{-1}), MoO_3 (0,71 mg L^{-1}), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1,57 mg L^{-1}), $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,49 mg L^{-1}), H_3BO_3 (11,42 mg L^{-1}), Na_2EDTA (50 mg L^{-1}), KOH (31 mg L^{-1}), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (4,98 mg L^{-1}).

4.2.5. Monitoramento e métodos analíticos aplicados

Os parâmetros analíticos determinados durante a operação foram balizadores para determinar qual é o melhor tratamento para o crescimento da cepa e determinar sua eficiência. O monitoramento dos biorreatores foi realizado sob temperatura controlada de 27° C e intensidade luminosa de 85 $\mu\text{E}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$. Os parâmetros de caracterização do lixiviado e seus respectivos métodos analíticos seguiram o que está preconizado em APHA (2012), exceto para

alcalinidade total (BUCHAUER, 1998) e clorofila “a” (JONES, 1979) Os equipamentos e métodos empregados na avaliação dos parâmetros estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros monitorados, métodos e equipamentos.

| Parâmetro | Método (APHA, 2012) | Equipamento(marca/modelo) |
|---------------------|-----------------------|---------------------------|
| pH | Eletrométrico 4500 B | HANNA Instrumentos/HI2300 |
| Turbidez | Nefelométrico 2130 B | QUIMIS/Q279P |
| Fósforo total | 4500-P-C | FEMTO 700 Plus- |
| Amônia | 4500-NH ₃ | TECNAL- TE-0363 |
| NTK | 4500-N _{org} | TECNAL/TE-0364 |
| Temperatura | Eletrométrico 4500 G | HANNA Instrumentos/HI2221 |
| Oxigênio Dissolvido | Método Eletrométrico | ALFAKIT- AT 155 |

As amostras foram tratadas em membrana de fibra de vidro de 0,45 e 0,22µm para subsequente análise em cromatógrafo iônico Dionex ICS-1100 da marca Thermo Scientific. A temperatura de operação foi 35° C, volume do Loop de 25 µL e o fluxo do eluente foi de 0,25 mL.min⁻¹. As condições operacionais das colunas estão descritas na Tabela 2.

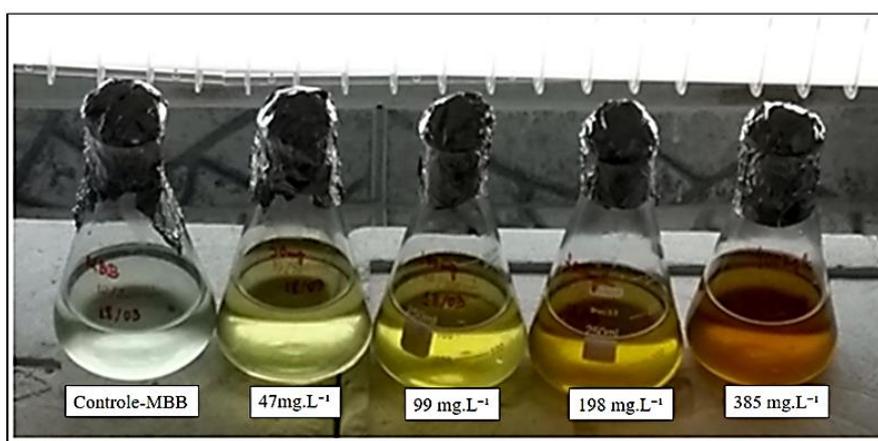
Tabela 2. Condições operacionais do cromatógrafo iônico.

| Análise de ânions | Parâmetro | Dionex Ion Pac AG23 |
|--------------------|--------------------------------|--|
| | Pré- Coluna | Dionex Ion Pac AG23 |
| | Supressora | ASRS 300 2 mm |
| | Eluente | Solução de Carbonato (4,5 mM) e Bicarbonato de Sódio (98 mM) |
| | Pressão na coluna e pré-coluna | < 1100 Psi |
| Análise de Cátions | Coluna Cromatográfica | Dionex Ion Pac CS 12A |
| | Pré- Coluna | CS CG 12 ^a |
| | Supressora | ASRS 300 2 mm |
| | Eluente | Solução de 10 mmol.L ⁻¹ de H ₂ SO ₄ . |
| | Pressão na coluna e pré-coluna | < 1100 Psi |

4.2.6. Etapa I - Produção de Biomassa em diferentes concentrações afluentes de N- Amoniacal

O potencial fitorremediativo da *Chlorella sp.* em diferentes diluições de LAS foi avaliado com base na capacidade de crescimento da cepa e na remoção de N-NH_4^+ . Foram testadas 4 concentrações de N-amoniacal afluentes e um controle positivo na proporção de 100 ml de MBB/2 ml de meio de cultivo da *Chlorella sp.* em fase estacionária. O LAS foi diluído com água destilada até atingir concentração afluente de 47, 99, 198 e 385 mg. L^{-1} de nitrogênio amoniacal. Os ensaios foram realizados em biorreatores mantidos em ambiente com fotoperíodo de 24 horas, temperatura controlada a 27°C, TDH de 168 horas. Foi coletada uma alíquota de 30mL de efluente tratado a 48, 120 e 168 horas para determinação do pH, Clorofila *a* e nitrogênio amoniacal. Na Figura 2 estão apresentados os biorreatores controle e com diferentes concentrações de N-amoniacal afluente.

Figura 2. Biorreatores com diferentes concentrações de N-amoniacal afluente.



4.2.7. Etapa II – Crescimento de *Chlorella sp.* em diferentes diluições de LAS

Foram montados 7 biorreatores, alimentados em regime de batelada. Destes, 1 foi o controle positivo, tendo MBB como substrato com 5,1 mg. L^{-1} de N-amoniacal, e 6 biorreatores receberam LAS *in natura* diluído em água destilada com diferentes concentrações afluentes de N-amoniacal. Cada biorreator foi alimentado com 500 ml de substrato, obtido pela diluição do lixiviado bruto com água destilada até atingir as diluições de 10, 20, 30, 40, 50 e lixiviado bruto a 100% v/v, sendo respectivamente 239, 511, 798, 970, 1142 e 2175 mg. L^{-1} , mais o controle positivo. Por exemplo, o lixiviado a 10% v / v foi obtido misturando 10 mL de lixiviado com 90 mL de água destilada.

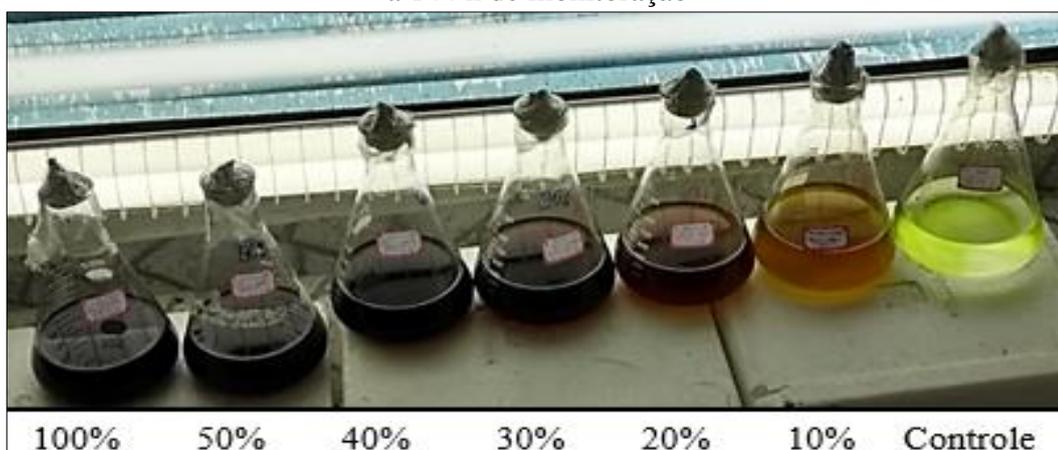
Estes biorreatores foram inoculados com 10 mL de meio de cultivo com *Chlorella* sp. em fase estacionária com densidade celular de $5,47 \times 10^4$ cel. mL⁻¹, sendo estes, mantidos em ambiente com fotoperíodo de 24 horas, temperatura controlada a 27^o C e TDH de 336 horas. No intervalo de cada 48 horas, foi coletada uma amostra de 50 mL, para determinação do pH, nitrogênio amoniacal, Oxigênio Dissolvido, Turbidez e densidade celular. Para contagem de células em câmara de Neubauer, uma alíquota de 5 mL, fixada com 10 gotas de lugol acético em concentração final de 4%, aguardou-se por 10 minutos e foi procedida a leitura. 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)

$$C \text{ (célula. mL}^{-1}\text{)} = \text{contagem total} \times 10^4 / n^{\circ} \text{ de blocos contados}$$

Equação 1

Na Figura 3 estão apresentados os biorreatores com diferentes diluições de LAS e controle avaliados antes do término da monitoração que foi até 336h.

Figura 3. Biorreatores com LAS a 100, 50, 40, 30, 20, 10% e controle positivo com avaliados a 144 h de monitoração



4.2.8. Etapa III - Testes de Avaliação da Toxicidade do Nitrogênio Amoniacal

Para avaliar a possível interferência do nitrogênio amoniacal na fisiologia da cepa de *Chlorella* sp., foram realizados ensaios conduzidos em triplicatas com investigando três diferentes substratos. Os parâmetros físico-químicos avaliados foram pH, OD, Turbidez, N-amoniacal, AT, AGV, Fósforo Total e Íons e microbiológico foi contagem celular em câmara de Neubauer. Na Tabela 3 esta apresentada a configuração dos sistemas.

Tabela 3. Configuração dos sistemas monitorados.

| Configuração | Sistema 1 | Sistema 2 | Sistema 3 |
|--|-----------------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| Volume de substrato(mL) | 1000 | 1000 | 1000 |
| Volume do inóculo(mL) | 50 | 50 | 50 |
| Substrato | LAS (<i>Stripping</i> de amônia) | LAS (diluído em água destilada) | MBB+ NH ₄ Cl |
| N- Amoniacal Afluente (mg.L⁻¹) | 6 | 100 | 140 |
| Regime de alimentação | Batelada | Batelada | Batelada |

Para realizar a separação do nitrogênio amoniacal do substrato (*Stripping* de amônia), 1 L de LAS, foi colocado em um frasco enlarmeyer de 2L, protegido da luz, temperatura de 27^o C estando submetido a aeração por uma bomba marca BOYUC, com vazão de ar por biorreator: 0.5 L. min⁻¹ por 168h. Após este TDH, foram diluídos 40 mL deste lixiviado em água destilada para preparação de cada 1 L de substrato. Com relação ao substrato de alimentação no Sistema 2, o LAS foi diluído em água destilada até atingir concentração de N-amoniacal desejada e para o sistema 3, foi preparado e esterelizado 1 litro de MBB e neste foi adicionado NH₄Cl até atingir a concentração de 140 mg.L⁻¹ de N-amoniacal.

4.2.9. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através de um planejamento full fatorial de três níveis Box-Behnken 3⁽²⁻⁰⁾ design (BBD) em combinação com metodologia de superfície de resposta (RSM) e análise de variância (ANOVA), através dos softwares Microsoft Excel 2013, Statistic 8.0 e Minitab 17.

O planejamento experimental Box- Behnken foi empregado para o experimento. Este planejamento permite a construção de um modelo polinomial de segunda ordem para caracterizar ou otimizar um processo com menor número de experimentos.

Dentro dos diferentes de níveis de TDH e % de lixiviado testados na fase experimental, foram selecionados apenas os níveis; baixo, médio e alto para composição do BBD. No estudo da remoção de nitrogênio amoniacal os níveis para TDH foram baixo: 0, médio: 6 e alto: 14 dias, enquanto o % de lixiviado presente do substrato de cultivo variou em baixo: 10, médio: 40 e alto: 100%. Na análise dos dados para turbidez, os níveis de tempo foram os mesmos utilizados na análise de nitrogênio amoniacal, contudo, o % de lixiviado variou em baixo: 10%, médio: 20% e alto: 40%, devido limitações da técnica turbidimétrica para soluções concentradas de lixiviado. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando os dados de caracterização físico-química do lixiviado, registra-se que os sólidos totais, com valor médio de 16003 mg.L^{-1} , sendo, 10573 para sólidos totais fixos e 5430 mg.L^{-1} para sólidos totais voláteis, este último, representando cerca de 34% dos sólidos totais, indicando uma baixa concentração de matéria orgânica presente na massa de resíduo. Segundo JORDÃO e PESSOA (1995), valores típicos, entre os sólidos totais voláteis e os sólidos totais (STV/ST), para lodo gerado em estações de tratamento de esgotos domésticos estão na faixa de 75% a 85%. Os sólidos podem aumentar a turbidez, dificultando a passagem da luz e comprometendo a fotossíntese.

O Mg^{2+} presente no LAS pode contribuir para o metabolismo energético das microalgas. Conforme Richmond, (1990), a função do magnésio é integrar o pigmento clorofila, sendo também necessário para ativar enzimas específicas, como a ATPase presente nas membranas tilacóides constituintes dos cloroplastos. Na Tabela 4 está apresentada a caracterização física e química do LAS aplicado na pesquisa.

Tabela 4. Caracterização Físico-química do lixiviado do ASMJP.

| PARÂMETROS | Magnitude |
|---|------------------|
| pH | 8,0 |
| Alcalinidade Total (mg CaCO ₃ L ⁻¹) | 8150 |
| NTK (mg L ⁻¹) | 2710 |
| Nitrogênio Amoniacal (mg L ⁻¹) | 2514 |
| Nitrogênio Orgânico (mg L ⁻¹) | 196 |
| Sólidos Totais (mg L ⁻¹) | 16003 |
| Sólidos Suspensos Voláteis (mgL ⁻¹) | 5430 |
| Sólidos Totais Fixos (mg.L ⁻¹) | 10573 |
| Sólidos Suspensos Totais (mg L ⁻¹) | 210 |
| Sólidos Suspensos Voláteis (mg.L ⁻¹) | 193 |
| Sólidos Suspensos Fixos (mg.L ⁻¹) | 17 |
| Fósforo Total (mg P L ⁻¹) | 18 |
| Ortofosfato (mg P-PO ₄ ³⁻ L ⁻¹) | 14 |
| Ácidos graxos Voláteis(H _{AC} L ⁻¹) | 472 |
| DQO total (mg O ₂ L ⁻¹) | 3648 |
| DQO solúvel (mg O ₂ L ⁻¹) | 2271 |
| DBO (mg. O ₂ . L ⁻¹) | 1163 |
| Cl ⁻ (mg.L ⁻¹) | 3620 |
| Na ⁺ (mg.L ⁻¹) | 2310 |
| Mg ²⁺ (mg.L ⁻¹) | 275 |
| Ca ²⁺ (mg.L ⁻¹) | 626 |
| K ⁺ (mg.L ⁻¹) | 2000 |

Fonte: Autora (2020)

A expressiva disponibilidade de macronutrientes a exemplo do fósforo e do nitrogênio no lixiviado pode favorecer o crescimento da biomassa, contudo, para a magnitude do nitrogênio amoniacal, é recomendável fazer a diluição do resíduo antes do tratamento. Segundo Procházková et al. (2014), para o crescimento ótimo das microalgas é necessária uma série de nutrientes, a exemplo de macronutrientes tais como, carbono (C), nitrogênio (N), oxigênio (O), hidrogênio (H) e fósforo (P), além de cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S) e potássio (K).

4.3.1. Etapa I - Produção de Biomassa em diferentes concentrações de N-amoniacal afluentes

A magnitude de sólidos totais presentes no LAS representada por 16005 mg.L⁻¹ pode interferir no processo da fotossíntese das microalgas, elevando a turbidez do meio, restringindo desta forma a passagem da luz, contudo, o pH foi sempre crescente para todos os biorreatores. O aumento do pH pode ter ocorrido devido a fixação do CO₂ que está presente no meio através da fotossíntese das microalgas, proporcionando uma maior dissociação de carbonato e bicarbonatos. Os biorreatores contendo 47 e 99 mg.L⁻¹ de N-amoniacal afluentes apresentaram maiores incrementos de pH, respectivamente 1,7 e 1,8 unidades, células com morfologia e volume preservados, durante 168 h de monitoração.

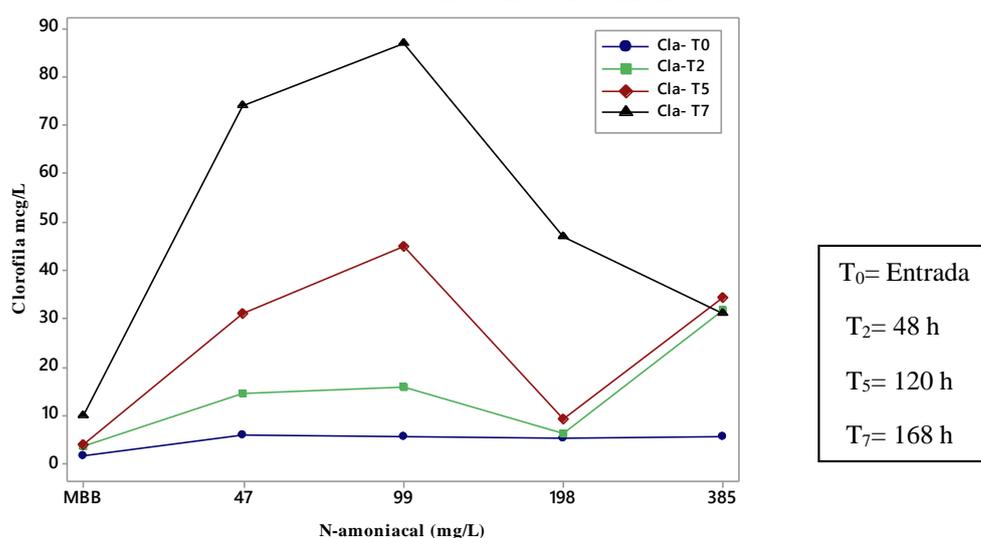
Este resultado sugere que nestas concentrações de nitrogênio amoniacal, não houve inibição da fotossíntese. No Biorreator controle, foi identificado um incremento de 1,6 unidades, uma vez que as condições de luminosidade, temperatura e nutrientes favoreciam amplamente ao crescimento de clorofíceas, contudo, neste, as células, analisadas ao microscópio apresentavam redução de tamanho de aproximadamente 60%, sugerindo indisponibilidade de nutrientes no meio.

A remoção de N-amoniacal em sistemas com diferentes concentrações afluentes variou entre 22 e 53% para 55% no controle. A remoção mais significativa foi percebida no sistema com concentração afluentes de 47 mg.L⁻¹. A menor remoção foi registrada no biorreator com 387 mg.L⁻¹ de nitrogênio amoniacal afluentes, que apresentou ao final de 168h de monitoração, 301 mg.L⁻¹ de amônia. Este baixo desempenho pode ser relacionado com a toxicidade do N-amoniacal quando este se encontra em elevadas concentrações.

Em estudo de Khan & Yoshida, (2008) foi confirmado que a glutamina sintetase desempenha um papel importante durante a assimilação de NH₄⁺-N por microalgas, enquanto a alta concentração de N-amoniacal inibiria a fotossíntese do cloroplasto e finalmente afetaria o crescimento de microalgas. Em nosso estudo a *Chlorella* sp. em condição trófica de autotrofia apresentou eficiência de remoção em todos os tratamentos. Corroborando com os resultados deste trabalho, para Franco Martinez et al. (2017), a *Chlorella vulgaris* não apresentou inibição em concentrações de amônio menores que 110 mg.L⁻¹. O comportamento das culturas foi semelhante ao obtido por González et al. (1997), que utilizaram *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus dimorphus* para a remoção do amônio de águas residuárias.

O incremento da concentração de Clorofila *a* variou entre 5,5 e 15 vezes. O aumento de biomassa microalgácea mais significativo e remoção de N-amoniaco simultâneas foram nas concentrações de 47 e 99 mg. L⁻¹ de N-amoniaco afluente, atingindo valores respectivos de 74 e 87 mcg.L⁻¹ de Clorofila *a*. O resultado menos significativo em termos de biomassa foi na concentração de 400mg.L⁻¹ de nitrogênio amoniaco, que, na entrada apresentou 5,6 mcg.L⁻¹ para 31 mcg. L⁻¹ ao fim da monitoração. A Figura 4 apresenta o incremento de clorofila *a* durante o ensaio.

Figura 4. Comportamento da variação temporal da concentração de Clorofila *a* no controle e diferentes tratamentos.



4.3.2. Etapa II- Crescimento de *Chlorella* sp. em diferentes diluições de LAS

No biorreator controle, em concentração de N-amoniaco afluente de 5,0 mg. L⁻¹, a *Chlorella* sp. apresentou um incremento de crescimento de 357% em 96h de monitoração, iniciando com $5,47 \times 10^4$ cél. mL⁻¹, atingindo $1,95 \times 10^5$ cél. mL⁻¹. A partir de 144 horas, a cultura entrou em fase de declínio progressivo até a densidade celular de $1,94 \times 10^4$ cél. mL⁻¹ ao final do experimento. No biorreator controle, todo o nitrogênio amoniaco presente na amostra foi removido até 48 horas de monitoração. Não foi registrado incremento significativo no pH em nenhum dos tratamentos contendo lixiviado. Os valores, que iniciaram em torno 8,6 atingiram 8,9 unidades.

4.3.2.1. Oxigênio Dissolvido

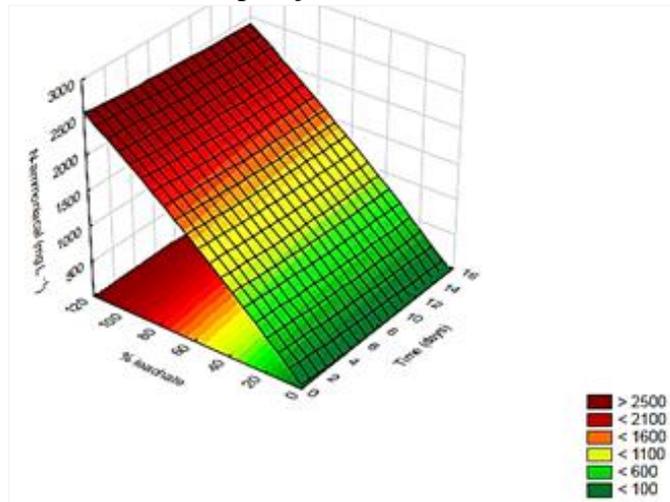
A concentração de oxigênio dissolvido sofreu uma redução progressiva nos sistemas com lixiviado *in natura* (100%), e nas diluições (50, 40, 30 e 20%), com recuperação gradativa a partir de 240 horas de monitoração, sem, contudo, atingir a concentração de entrada (que variou entre 1,7 e 5,1 mg.L⁻¹) até o término do ensaio. No sistema com lixiviado em diluição de 10% a concentração inicial de oxigênio dissolvido foi 5,7 mg. L⁻¹, atingindo 10,6 mg.L⁻¹ em 144h de monitoração, sofrendo decréscimo progressivo até as 336 h, atingindo ao final com 6 mg.O₂.L⁻¹.

Este acréscimo de oxigênio no sistema pode ser explicado pois, durante a fotossíntese, as algas, na presença de luz, assimilam CO₂ e H₂O, e sintetizam CH₂O e O₂. Este comportamento temporal do oxigênio no sistema pode também ser relacionado com o incremento de turbidez registrado no biorreator com lixiviado a 10% e a DCM (Densidade Celular Máxima), que foram mais amplas do que nos demais tratamentos. Este resultado nos permite inferir que na concentração de N-amoniacoal de 239 mg.L⁻¹ afluyente e nas condições de cultivo descritas, a *Chlorella* sp. consegue a realizar sua atividade metabólica de forma eficiente.

4.3.2.2. N-amoniacoal

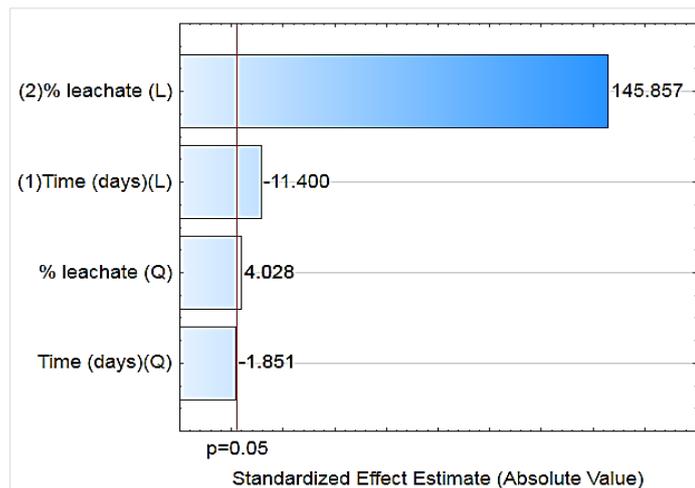
Foram obtidas remoções de nitrogênio amoniacoal em todos os tratamentos, destacando que, nas concentrações maiores foram obtidas remoções menores. Nas diluições de 50, 30 e 20% foram obtidas as remoções respectivas de 11, 22 e 26%. O resultado do planejamento experimental Box-Behnken para as diluições de 10, 40 e 100%. Na Figura 5 está apresentado o resultado da MSR (Metodologia da Superfície de Resposta) para influência do tempo e do % de lixiviado no crescimento da *Chlorella* sp. e remoção de N-amoniacoal

Figura 5 - MSR para N-amoniaco sob influência do tempo e do % de lixiviado na composição do substrato.



Conforme indica a MSR, a remoção de N-amoniaco estabelece relações predominantemente lineares com o efeito do tempo e do percentual de lixiviado no substrato de cultivo. A superfície também indicou que, o aumento no % de lixiviado diminui a eficiência de remoção de nitrogênio. Estes dados corroboram com a informação discutida previamente, de que o aumento no teor de nitrogênio amoniaco no meio de cultivo pode apresentar toxicidade sobre a biomassa algal, atenuando sua atividade metabólica. A MSR sugere ainda, que o tempo é menos expressivo na remoção de nitrogênio, quando comparado a influência exercida pelo % de lixiviado. Na Figura 6 estão apresentadas através do gráfico de estimativa dos efeitos padronizados (Diagrama de Pareto), as informações acerca do efeito do tempo e do % de lixiviado na remoção de nitrogênio.

Figura 6. Diagrama de Pareto para interferência do tempo e % de lixiviado na remoção de N-amoniaco.



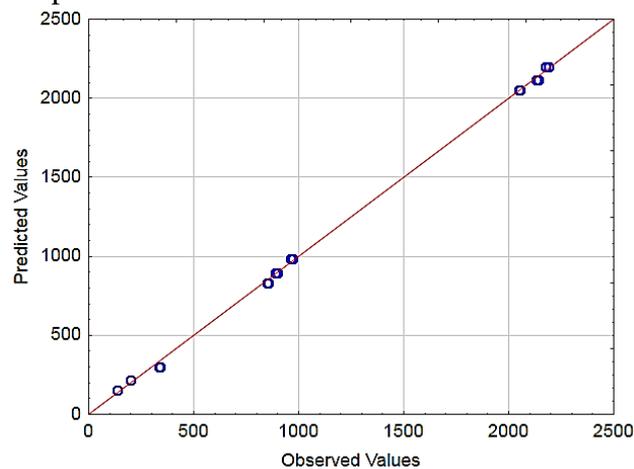
Conforme apresentado na Figura 6, os efeitos que são estatisticamente importantes no modelo matemático, portanto estão a direita da linha ($p=0,05$) estão relacionados com % de lixiviado que, exerceu maior influência sobre a remoção de nitrogênio em comparação ao tempo. Isto pode ser explicado pois, a mudança nos níveis de nitrogênio amoniacal na entrada do sistema pode ter causado prejuízo ao metabolismo algal. Tanto o tempo quanto % de lixiviado exerceram influência, em termos lineares, sob a remoção de nitrogênio. Apenas o % de lixiviado apresentou influência em termos quadráticos, contudo, esta influência não foi tão expressiva, o que explica o perfil plano para a superfície de resposta. O modelo matemático gerado no presente estudo é apresentado na Equação 2, no qual é possível estimar os níveis de nitrogênio a partir das condições de tempo e % de lixiviado de um sistema experimental.

$$N\text{-amoniacal (mg L}^{-1}\text{)} = 66,561 - 16,699*\text{tempo} + 0,4360*\text{tempo}^2 + 23,911*(\% \text{ lixiviado}) - 0,0256*(\% \text{ lixiviado})^2.$$

Equação 2

A viabilidade deste modelo experimental pode ser constatada a partir da análise do gráfico de valores preditos versus observados apresentado na Figura 7, que demonstra através da localização dos resultados obtidos (pontos sobre a reta de valores preditos) que o modelo matemático obtido pode ser empregado no dimensionamento de sistemas de tratamento, apresentando: R múltiplo = 0,9997; R^2 múltiplo = 0,9994; R^2 ajustado = 0,9993; F 27051,91 e $p < 0,00$.

Figura 7. Valores preditos versus observados do modelo matemático aplicado.

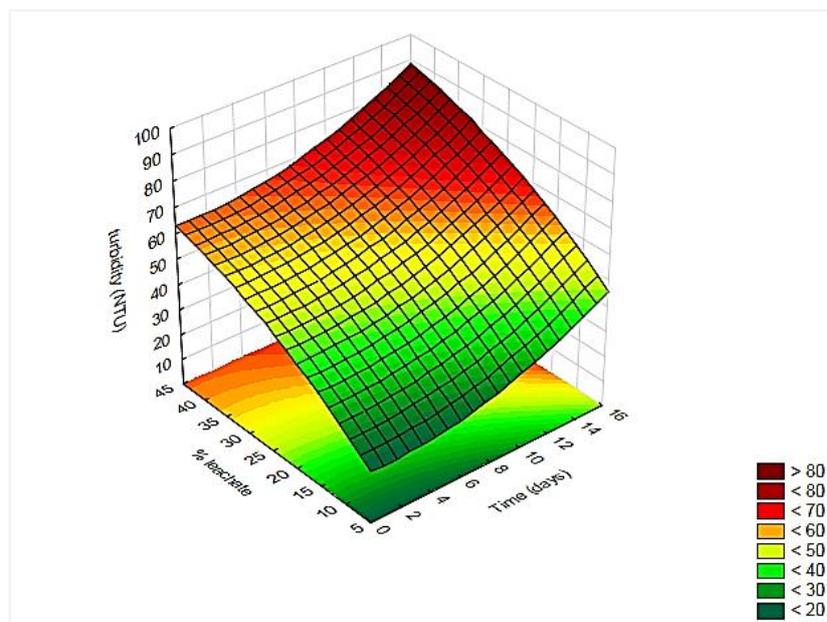


4.3.2.3. Turbidez

A turbidez nos sistemas com lixiviado diluído a 50, 40, 30 e 20%, ocorreram incrementos respectivos de 16, 26, 27 e 11%, atingindo os valores 70, 82, 50 e 47 NTU em 336 h. o controle teve turbidez inicial de 7,2 NTU alcançando

Este aumento na turbidez pode estar relacionado com o aumento da densidade celular nas amostras. No tratamento com diluição a 10%, a turbidez apresentou maior incremento aproximando-se do resultado observado no controle, com incrementos respectivos de 64 e 57%. Corroborando com este resultado de crescimento, Khanzada & Övez (2018) obtiveram resposta similar para cultivo de *Chlorella vulgaris* e *Chlamydomonas reinhardtii*, cultivadas em LAS puro e diluído a 10, 30,50,70 e 90%, tendo como controle positivo o meio BG11 para cultivo de algas. Na Figura 8 está apresentada metodologia de superfície de resposta para a turbidez sob influência do tempo (0, 6 e 14 dias) e do % de lixiviado nas proporções de 10, 20 e 40%.

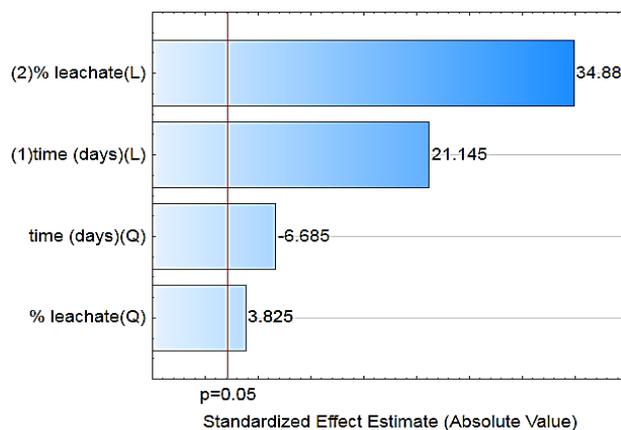
Figura 8. MSR para turbidez sob influência do tempo e do % de lixiviado na composição do substrato.



Conforme observado nas curvas de nível obtidas na RSM da Figura 8, a qual fornece uma análise da tendência de resposta da variável dependente (nível de turbidez no sistema), o aumento do % de lixiviado e do tempo ampliam os níveis de turbidez no sistema experimental. No caso do % de lixiviado, esta influência sobre a turbidez está relacionado aos níveis de

turbidez de entrada que são uma consequência do aumento do % de lixiviado no substrato de cultivo. Em relação ao tempo, é possível verificar que, do instante 0 ao 6^o, os níveis de turbidez permanecem praticamente constantes, aumentando a partir do 6^o dia em função do crescimento celular no meio reacional. O gráfico dos efeitos padronizados está apresentado na Figura 9 a seguir.

Figura 9. Gráfico de Pareto para tempo e % de lixiviado na remoção de N-amoniacal.



Conforme análise, o diagrama de Pareto indica que, o tempo e o % de lixiviado foram significativos, tanto em termos lineares quanto quadráticos, todavia, os termos lineares foram mais expressivos, o que explica a tendência da superfície de resposta para um perfil plano. Diferentemente dos resultados obtidos para N-amoniacal, a turbidez sofre uma influência expressiva do tempo e do % de lixiviado. O modelo matemático gerado no presente estudo é apresentado na equação 3, no qual é possível estimar os níveis de turbidez a partir das condições de tempo e % de lixiviado de um sistema experimental.

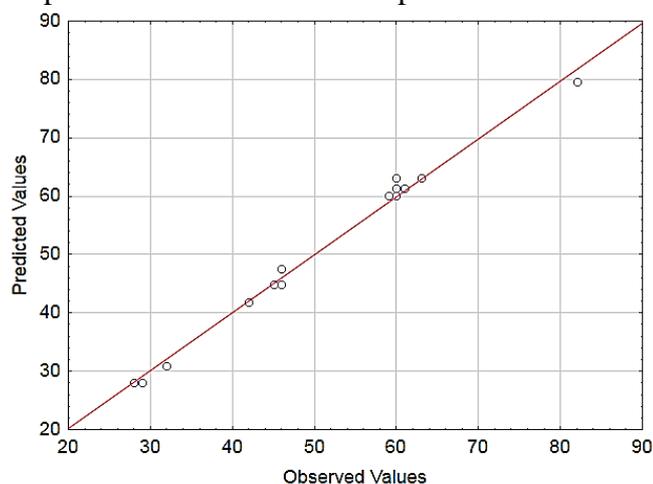
$$Turbidez = 11.055 - 0.1696*tempo + 0.1116*tempo^2 + 1.85*(\% \text{ lixiviado}) - 0.0155*(\% \text{ lixiviado})^2$$

Equação 3

A acurácia desta modelagem pode ser constatada a partir do gráfico de valores preditos versus observados apresentado na Figura 10, que demonstra que os valores dos desvios-padrão são muito próximos dos resultados obtidos, portanto, o modelo matemático obtido na análise destes ensaios, pode ser empregado no dimensionamento de sistemas de tratamento,

apresentando: R múltiplo = 0,9962; R² múltiplo = 0,9925; R² ajustado = 0,9921; F 2145,44 e p < 0,00.

Figura 10. Valores preditos versus observados para do modelo matemático aplicado.



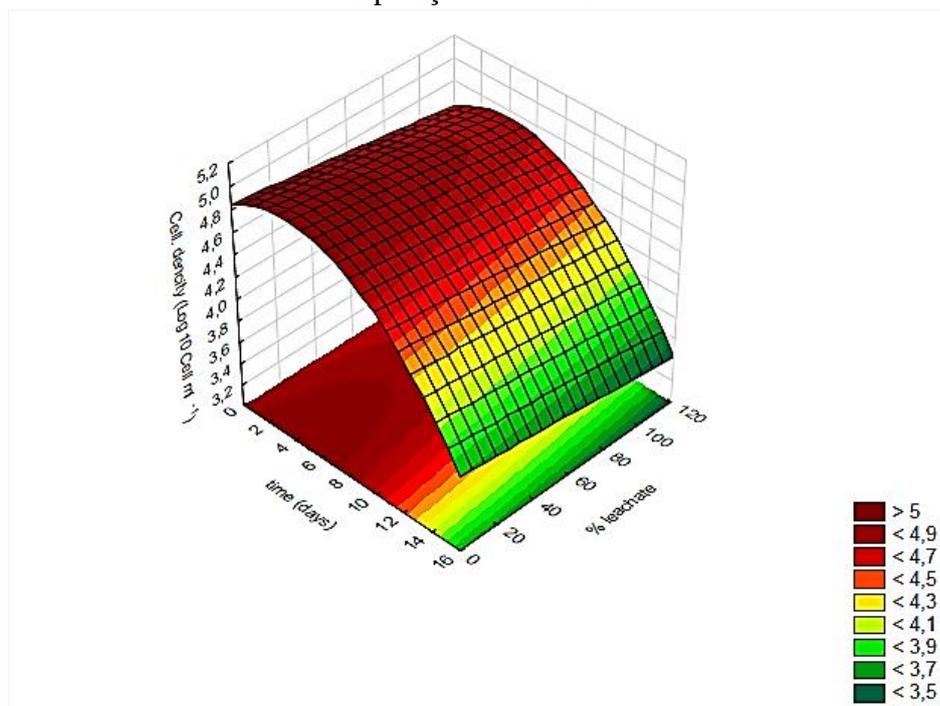
4.3.2.4. Densidade celular

O crescimento celular no substrato controle (constituído por MBB) apresentou, como era esperado em comparação com os demais tratamentos, atingiu maior DCM de $1,95 \times 10^5$ cél. mL⁻¹ em 96h de TDH. Contudo, durante todo o período, as células apresentaram volume de aproximadamente 50% das células que receberam tratamento com lixiviado diluído. Resultado semelhante foi revelado em achados microscópicos desenvolvidos por El Quaer et al. (2019) cultivando *Chlorella* sp. em lixiviado de aterro sanitário, identificaram que as células cultivadas em lixiviado em diluição de 10% eram maiores e de cor mais intensa do que as células do controle positivo, sendo este, o mesmo usado neste estudo. Identificaram ainda, que neste substrato com concentração média de N-amoniaco de 257 mg.L⁻¹, o crescimento celular de *Chlorella* sp., foi aproximadamente 10 vezes maior em termos de teor de *Clorofila* em comparação com o resultado obtido para o padrão meio de cultura, Meio Basal de Bold.

Foram registrados crescimento celular em todos os tratamentos, inclusive no LAS “in natura” (100%), que apresentou a menor remoção de N-amoniaco (6%). Este fato pode ser explicado pois, a elevada turbidez média da amostra de aproximadamente 50 NTU pode ter dificultado a passagem luz, comprometendo a fotossíntese. Este resultado pode estar relacionado ainda, com a inibição do nitrogênio amoniaco no meio reacional quando este se

encontra em elevadas magnitudes a exemplo das testadas. Em estudo de Franco Martinez et al. (2017) a *Chlorella vulgaris* não apresentou inibição em concentrações de amônio menores que 110 mg. L^{-1} . O comportamento das culturas foi semelhante ao obtido por González et al. (1997) que cultivaram *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus dimorphus* para a remoção do amônio de águas residuárias. Na Figura 11 está apresentada a MSR para a densidade da *Chlorella* sp. sob influência dos 3 tempo (mínimo, médio e máximo, respectivamente 0, 6 e 14 dias) e do % de lixiviado (10, 40 e 100%) na composição do substrato.

Figura 11. MSR para densidade celular sob influência do tempo e do % de lixiviado na composição do substrato.

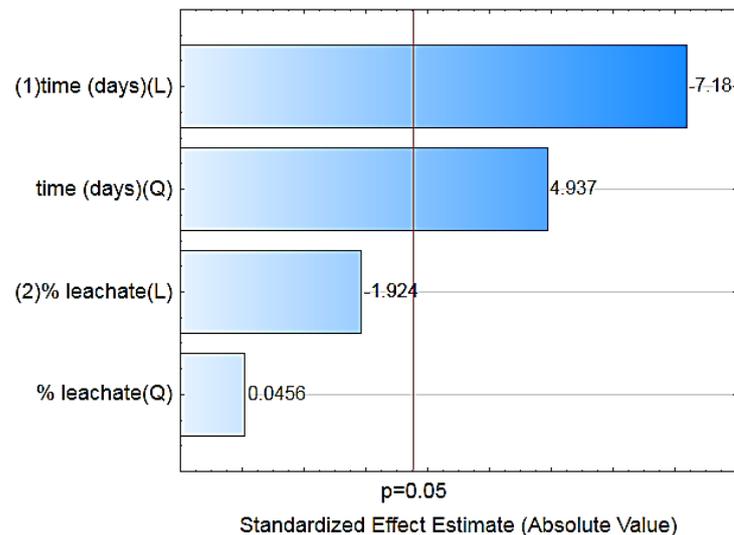


De acordo com a superfície de resposta, o crescimento celular ocorre do instante zero até o 6^o dia, no qual é obtida a DCM (densidade celular máxima). A partir deste período, é observado um declínio acentuado na densidade de *Chlorella* sp. El Quaer et al. (2019), cultivando *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. em lixiviado com magnitude N-amoniacafluyente de 2570 mg.L^{-1} , concluíram que apenas a cepa de *Chlorella* sp. adaptou-se densidades ao meio e apresentou densidades importantes, contudo que o lixiviado exerceu de inibição completa para o *Scenedesmus* sp.

Neste estudo, foi possível verificar que o aumento no % de lixiviado atenua o crescimento celular, o que corrobora com a discussão prévia de que os aumentos nos níveis de

nitrogênio podem acarretar efeitos inibitórios no metabolismo celular. Contudo, o efeito do % de lixiviado não foi tão expressivo quanto o efeito do tempo. Apesar do declínio celular identificado a partir do 6º dia, os níveis de turbidez aumentam gradativamente. Este comportamento é explicado pelo fato de que, mesmo ocorrendo morte celular, as estruturas biológicas permanecem no meio promovendo espalhamento de luz. O gráfico dos efeitos padronizados está apresentado na Figura 12.

Figura 12. Diagrama de Pareto para tempo e % de LAS no estudo da densidade celular.



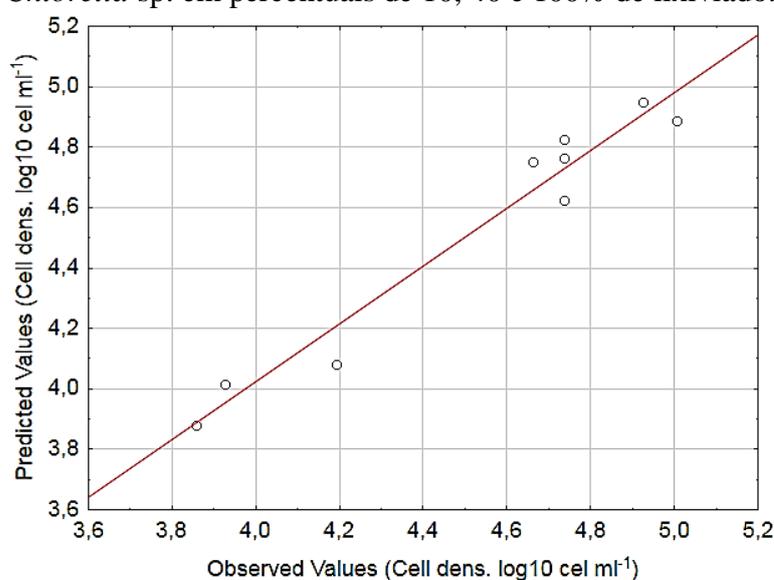
O diagrama de Pareto revelou que apenas o tempo possui efeito significativo em termos quadráticos e lineares. O efeito em termos quadráticos apresenta sinal positivo e está relacionado a fase de crescimento celular do instante 0 até o limiar da fase de declínio (meados do 7º dia). Neste intervalo de tempo é possível observar um perfil parabólico na superfície de resposta. O efeito em termos lineares tem sinal negativo e está relacionado a fase de declínio celular que inicia em torno do 7º dia. O efeito do % de lixiviado não foi significativo, contudo, influencia negativamente o crescimento celular, conforme discutido previamente. O modelo matemático obtido neste estudo é apresentado na Equação 4.

$$DC = (\log_{10} \text{ cel. ml}^{-1}) = 4.845 + 0.0766 * \text{tempo} - 0.0092 * \text{tempo}^2 - 0.0019 * (\% \text{ lixiviado}) - 0.000002 * (\% \text{ lixiviado})^2.$$

Equação 4

O resultado de teste de validação deste modelo é apresentado no gráfico de valores preditos versus observados, (Figura 13). É importante ressaltar que a marcha analítica para determinação da densidade celular envolve procedimentos que podem conferir incerteza ao método. Isto se dá principalmente pela ausência de uniformidade na distribuição das células nos campos visão para contagem em câmara de Neubauer, o que pode acarretar em valores aproximados de contagem, conforme indicado no gráfico de valores preditos versus observados da Figura 13. O modelo matemático apresentou níveis aceitáveis para os parâmetros de validação: R múltiplo = 0,9775; R² múltiplo = 0,9557; R² ajustado = 0,9493; F = 151,01 e p < 0,00.

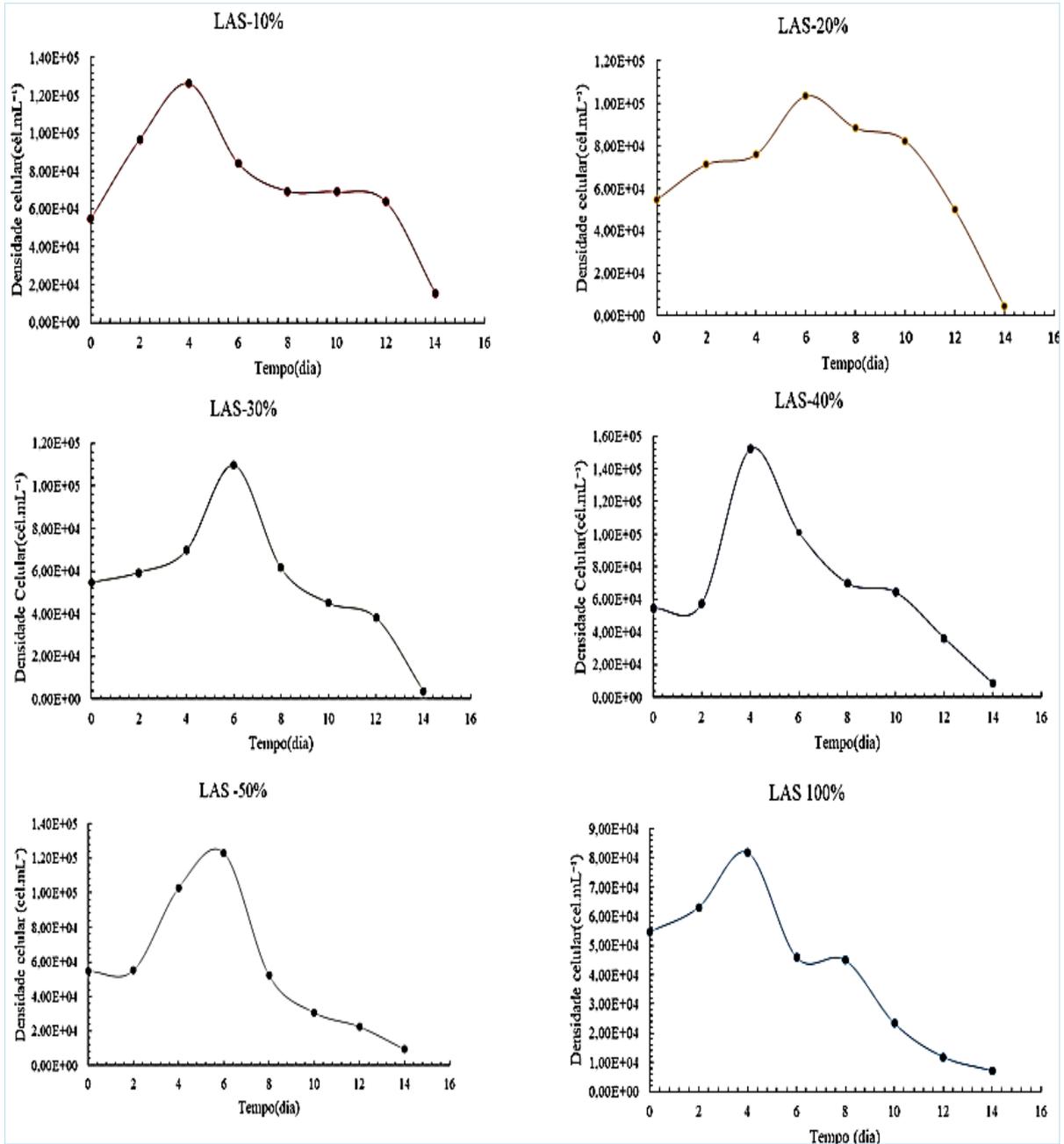
Figura 13. Valores preditos versus observados do modelo matemático de crescimento da *Chlorella* sp. em percentuais de 10, 40 e 100% de lixiviado.



Os maiores crescimentos registrados até 96h de monitoração foram em diluição a 10 e 40%, com valores iniciais de $5,47 \times 10^4$ cél. mL⁻¹ atingindo respectivamente $1,26 \times 10^5$ e $1,52 \times 10^5$ cél. mL⁻¹, com incrementos percentuais respectivos de 230 e 278 %.

Segundo Sforza et al. (2015), a cor escura do lixiviado pode reduzir significativamente a penetração da luz na solução, o que pode prejudicar a fotossíntese da microalga e consequente produção de biomassa. Além disto, uma alta concentração de N- amoniacal na forma ionizada presente no lixiviado pode conferir um efeito comprometedor à fisiologia algácea, contudo, defendem os autores que é viável, o cultivo de microalgas em lixiviado de aterro sanitário com concentrações de nitrogênio amoniacal afluyente variando entre 100 a 200 mg. L⁻¹. Na Figura 14 estão apresentadas as curvas de crescimento da *Chlorella* sp. nos diferentes tratamentos.

Figura 14. Curvas de crescimento da *Chlorella* sp. em diferentes concentrações de N-amoniacoal.



Fonte: Autora (2020)

4.3.3. Etapa III - Testes para avaliação da toxicidade do Nitrogênio amoniacoal

4.3.3.1. Remoção de Nitrogênio amoniacoal

Nos três tratamentos (LAS Stripping, LAS diluído em concentração de N-amoniacoal de 100 mg.L⁻¹ e MBB+NH₄Cl) ocorreu remoção de nitrogênio amoniacoal, sendo identificada remoção completa, no LAS diluído que passou por processo de *Stripping* de amônia, que apresentou 6 mg.L⁻¹ de N- amoniacoal na entrada. O sistema com concentração de nitrogênio amoniacoal afluente de 99 mg.L⁻¹ apresentou uma remoção de 49% com incremento de oxigênio dissolvido de 245% e variação de 1,7 unidades de pH em até 96 h de monitoração. Estes valores são indicativos que de que houve atividade fotossintética pelas microalgas.

No sistema com MBB adicionado o NH₄Cl, não houve variação para o pH e oxigênio dissolvido, sendo registrada uma remoção de 20% de nitrogênio amoniacoal e aumento expressivo na turbidez a partir de 240h de monitoração. Este aumento na turbidez pode estar relacionado com o estágio da cultura que entrou em declínio desde 96h de monitoração, apresentando 1,404 x 10⁵ cél.mL⁻¹ a 192h e 1,256 x 10⁵ cél. mL⁻¹ a 240 h, portanto apresentando material orgânico resultante da progressiva morte celular.

4.3.3.2. Remoção de Íons

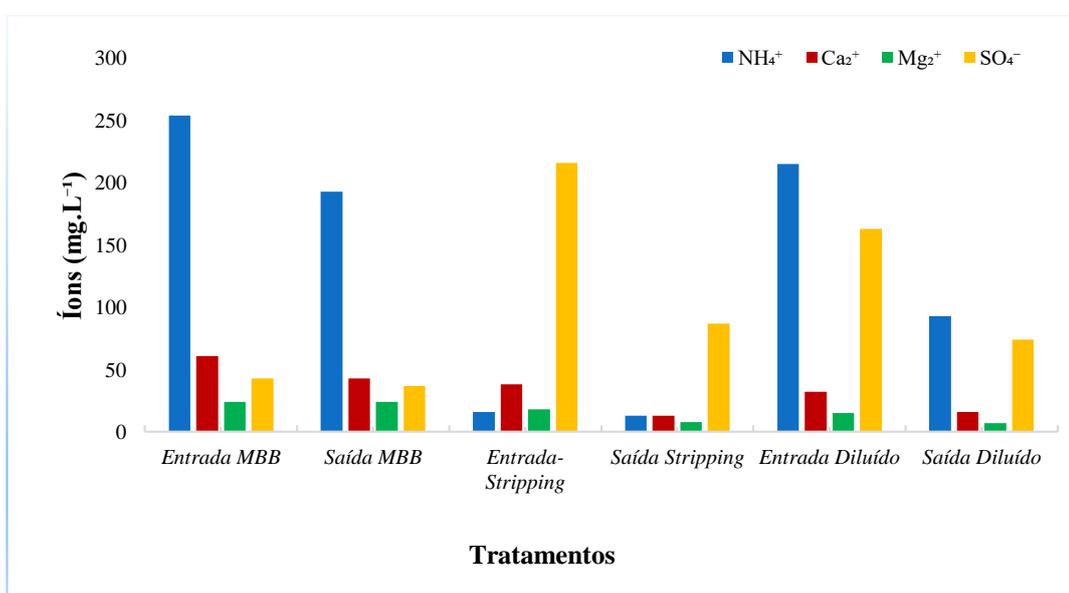
Diversos íons são interferentes no metabolismo das microalgas, sendo desta forma, necessária sua presença no meio reacional para que ocorra a incorporação de macronutrientes a exemplo do nitrogênio. Na análise da remoção de NH₄⁺, Ca²⁺, SO₄⁻ e Mg²⁺ foi constatada menor eficiência no sistema alimentado com MBB+NH₄Cl, enquanto que, no sistema com LAS diluído e concentração afluente média de N- amoniacoal de 99 mg.L⁻¹m foi obtida remoção de 57, 50, 53 e 55% respectivamente para os íons citados. Segundo Wojciechowski et al. 2013, o cálcio participa da composição da membrana celular e permite a agregação de células algais em colônias. Além disso, sua dinâmica de formas (CaCO⁻ e CaCO₃) influenciam na reciclagem de fosfato e no equilíbrio do pH.

Na concepção de Beuckels et al. (2015) o íon amônio é a forma preferencial para a absorção por microalgas, uma vez que, o nitrato dentro da célula será reduzido à amônio para ser assimilado em aminoácidos, utilizados na síntese proteica. O magnésio integra a molécula de clorofila, ligando-a aos nitrogênios e possibilitando a transferência de fosfato nas reações do ATP. Esse elemento também participa de outros processos metabólicos, como o do nitrogênio e contribui para a estabilidade dos ribossomos. Corroborando com este trabalho, Richmond (1990), pontua que a função do magnésio é integrar o pigmento clorofila, sendo também

necessário para ativar enzimas específicas, como a ATPase presente nas membranas tilacóides constituintes dos cloroplastos.

O sistema no qual o lixiviado recebeu tratamento de *Stripping* de amônia, foi constatada remoção de 56% para o íon Mg^{2+} e 66% para o íon Ca^{2+} , fato este, que pode explicar o incremento celular de 152% em 288h de monitoração. À Luz de Procházková et al. (2014), para o crescimento ótimo das microalgas é necessária uma série de nutrientes, a exemplo de macronutrientes tais como, carbono (C), nitrogênio (N), oxigênio (O), hidrogênio (H) e fósforo (P), além de cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S) e potássio (K). O Lixiviado aplicado neste estudo apresenta todos os elementos citados em sua composição. Na Figura 15 está apresentado o perfil do comportamento das variações temporais do NH_4^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e SO_4^- para os três tratamentos testados.

Figura 15. Remoção de íons por *Chlorella* sp. nos três tratamentos aplicados.



4.3.3.3. Turbidez

A turbidez é uma propriedade física dos fluidos que se traduz na redução da transparência devido a presença de materiais em suspensão. Neste estudo, foram registrados incrementos de turbidez de 280, 433 e 930%, sendo este último, observado no sistema com LAS diluído que atingiu turbidez de 103 NTU a 384h de monitoração. Estes incrementos de turbidez podem estar relacionados com o aumento da densidade celular algal ocorrido em todos os tratamentos.

4.3.3.4. O crescimento da *Chlorella* sp. em diferentes substratos

A análise das curvas de crescimento da *Chlorella* sp. indica que o nitrogênio amoniacal no meio, em concentração afluyente de 100 mg.L^{-1} , melhora o desempenho na fase *Lag*. No sistema com de nitrogênio amoniacal, a cepa recebeu um incremento na densidade celular de 95% em 48h, apresentando na entrada $1,55 \times 10^5 \text{ cél. mL}^{-1}$, atingindo $2,99 \times 10^5 \text{ cél. mL}^{-1}$, atingindo densidade celular máxima (DCM) de $1,176 \times 10^6 \text{ cél. mL}^{-1}$ em 240h, enquanto que para o sistema no qual o substrato que foi tratado com *Stripping* de amônia, o incremento registrado foi de 2% atingindo $1,93 \times 10^5 \text{ cél. mL}^{-1}$ em 48h e DCM apenas em 288h. Para o sistema com MBB+ NH_4Cl , o incremento celular percebido em 48 h foi de 73% e, a partir 96h a cultura já estava em fase de declínio sempre progressivo até o término da monitoração. Este resultado pode ser indicativo de que a amônia em concentrações elevadas pode ser tóxica à célula.

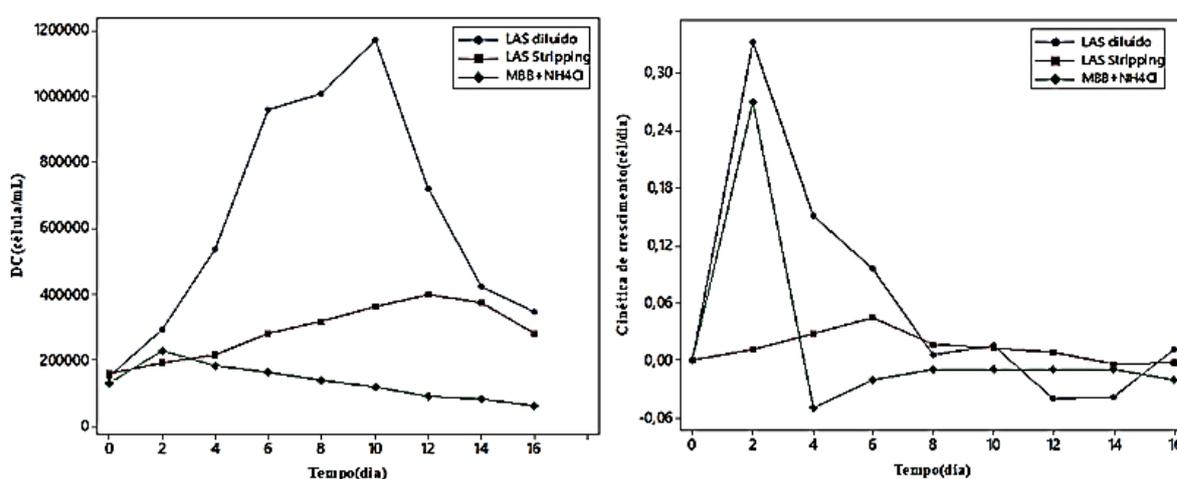
Em trabalho desenvolvido por Tagliaferro et al. (2019), cultivando *Chlorella minutissima* em lixiviado de aterro sanitário diluído, observou-se diminuição inicial na concentração de biomassa, quando foi utilizada diluição a 10%, indicando que as células precisavam de um período de adaptação a nova condição.

O estudo da utilização do lixiviado de aterro sanitário para o crescimento de microalgas se justifica pelo amplo aporte de macronutrientes necessários à fisiologia das microalgas presentes nesse resíduo. Segundo Ghosh et al. (2017), é importante também considerar os compostos tóxicos tais como: fenol, benzeno, tolueno, acetona, nitrogênio amoniacal, fosfato, metais pesados (Pb, Cd, Cu, Zn, Cr e Ni), sulfatos, ácidos, álcalis e sais inorgânicos (CHEAH et al., 2016). Corroborando com esses resultados, Oliveira (2019), caracterizou o lixiviado “in natura” proveniente do ASMJP a partir do emprego de ELL (Extração Líquido líquido) seguida de CG-EM (Cromatografia gasosa-Espectrometria de massa), identificou 27 compostos orgânicos recalcitrantes dos quais 6, podem provocar mutação no DNA.

Na análise dos dados dessa pesquisa, o crescimento de *Chlorella* sp. observado no lixiviado diluído é um indicativo de que este resíduo líquido proveniente do ASMJP é um meio de crescimento favorável para a Chlorophyceae, sugerindo ser esta, uma cepa resistente a alguns poluentes específicos presentes no lixiviado de aterro, o que poderia explicar a especificidade e a estrutura característica da célula. Segundo Brooks & Shaw (1978), a parede celular da *Chlorella* sp. é composta por três camadas diferentes (mucilaginosa, a mediana formada por pectina e uma celulósica). As camadas externa e média (exina), são composta por esporopolenina, gordura, flavonóides e vitaminas lipossolúveis. A exina é muito resistente a

vários parâmetros externos. A esporopolenina é um polímero natural que é fortemente resistente a ataques químicos e tem a particularidade de fixar compostos tóxicos como elemento metálico, pesticidas, inseticidas e vários fertilizantes químicos (ALSHEHRI et al. 2016). Essas particularidades fisiológicas pode ter conferido maior adaptabilidade da *Chlorella* sp. ao LAS in natura do ASMJP. Na Figura 16 estão apresentados os valores médios das densidades celulares e cinética de crescimento da *Chlorella* sp. em diferentes substratos.

Figura 16. Densidade celular média e cinética de crescimento da *Chlorella* sp. em diferentes substratos.



Fonte: Autora (2020)

A partir da análise dos dados da Figura 16, registra-se que as maiores velocidades de crescimento para os sistemas com 100, 6 e 140 mg.L⁻¹ de nitrogênio amoniacal afluentes foram de 0,1665, 0,007 e 0,1366 d⁻¹. Na concepção de Oswald (1988) a análise estequiométrica das microalgas (C₁₀₆H₁₈₁O₄₅N₁₆P) indica que aproximadamente 9% da massa seca das microalgas é composta por nitrogênio (N). Os valores para DC e velocidade de crescimento (Figura 16) reforçam a necessidade de um bom aporte de N- amoniacal no substrato para promover crescimento microalgáceo.

4.4. CONCLUSÃO

Frente à análise dos dados deste trabalho, pode-se concluir que:

- O Lixiviado de aterro sanitário diluído em concentrações afluentes média de N-amoniacal de 100 mg.L^{-1} , promoveu um desenvolvimento metabólico positivo das microalgas em sistemas livres, representado por incrementos de pH de 1,7 unidades e aumento na Clorofila *a* de aproximadamente 15 vezes;
- Os resultados obtidos na etapa II deste estudo, permitem verificar que o aumento no % de lixiviado atenua o crescimento celular, o que corrobora com a discussão prévia de que os aumentos nos níveis de nitrogênio podem acarretar efeitos inibitórios no metabolismo sugerindo que, em baixas concentrações ocorreu um efeito benéfico no crescimento da *Chlorella* sp., contudo, quanto maior a concentração de exposição, foi maior o efeito inibitório;
- Os resultados apresentados na Etapa III (remoção de N-amoniacal, de íons e cinética de crescimento), apontam para a importância do N-amoniacal no crescimento da *Chlorella* sp.. A menor velocidade de crescimento registrada foi no sistema no qual o lixiviado havia passado por processo de *Stripping de amônia* com velocidade de crescimento máxima de $0,003 \text{ d}^{-1}$ até o 6º dia de monitoração
- Na conjuntura brasileira atual e em regiões ou cidades em que existem já instalados e em operação os aterros sanitários, a escolha da fitorremediação da água residuária proveniente da degradação dos resíduos sólidos a partir da *Chlorella* sp.se apresenta como uma biotecnologia viável e eficiente na recuperação de recursos. Ressaltando-se ainda, que são sistemas de fácil monitoração, baixo custo, com alto poder de sequestro de gás de e efeito estufa e potencial produção de biomassa útil.

REFERÊNCIAS

- ABOOD, A.R.; BAO, J.; DU, J.; ZHENG, D.; LUO, Y. Non-biodegradable landfill leachate treatment by combined process of agitation, coagulation, SBR and filtration, **Waste Management**, v. 34, p. 439–447, 2014.
- ALSHEHRI, S. M.; AL-LOHEDAN, H. A.; CHAUDHARY, A. A. Delivery of ibuprofen by natural macroporous sporopollenin exine capsules extracted from *Phoenix dactylifera* L. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, p.158–165, 2016.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION -APHA, AWWA, WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22th ed. **Washington, D.C**, 2012.
- BICUDO, C.E.M e MENEZES, M. Gêneros de Algas de Águas Continentais do Brasil: Chave para identificação e descrições. **Rima**. 508p, 2006.
- BISCHOFF, H. W.; BOLD, H. C. Physiologic studies. IV. Some algae from Enchanted rock and related algae species. **University of Texas Publications**, v. 6318. p.1- 5,1963.
- BOROWITZKA, M. A. Micro-algal Biotechnology Cambridge. **University Press. Cambridge**, 1988.
- BROOKS, J & SHAW, G. Sporopollenin: a review of its chemistry, palaeochemistry and geochemistry. **Grana**, v. 17, p. 91–97, 1978.
- BEUCKELS, A.; SMOLDERS.; MUYLAERT, K. Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae based wastewater treatment, **Water Research**, v. 77, p. 98–106, 2015.
- BUCHAUER, K. A comparison of two simple titration procedures to determine volatile fatty acids in influents to wastewater and sludge treatment process. **Water SA**, v.24, n^o 1, p. 49-56, 1998.
- CHEAH, W.Y.; LING, T.C.; SHOW P.L.; JUAN, J.C.; CHANG, J.S.; LEE, D.J. Cultivation in wastewaters for energy: a microalgae platform, **Appl. Energy**, v. 179, p. 609–625, 2016.
- EDMUNDSON, S.J AND WILKIE, A.C. Landfill leachate - a water and nutrient resource for algae-based biofuels. **Environmental Technology**, v. 34, p. 1849-1857, 2013.
- EL QUAER, M.; TURKI, N.; KALLEL, A.; HALAOUI, M.; TRABELSI, I.; HASSEN, A. Recovery of landfill leachate as culture medium for two microalgae: *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. **Environment, Development and Sustainability. Springer Nature**. p.1-21, 2019.
- GHOSH, P.; THAKUR, I.S.; KAUSHIK, A. Bioassays for toxicological risk assessment of landfill leachate: a review, **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 141, p.259–270, 2017.
- GORHAM, P.R.; MCLACHLAN, J.; HAMMER, U.T.; KIM, W.K. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyng) de Breb. **Verh. Int. Verein. Limnol.** v. 15, p.796-804, 1964.

GUERRERO III, R.D.; VILLEGAS, C, T. Report of the training course on growing food organism for fish hatcheries. Phillipines, South China. **Sea Fisheries Development/Coordinating Programam-** 1982.

JONES, J. G. Aguide to methods in freshwatus, London, **Freshwater Biological Association**, n°39, 112p, 1979.

JORDÃO, E. P.; PESSOA, C, A. Tratamento de Esgoto Domésticos. 3ª Edição – **ABES**. Rio de Janeiro, 681p. 1995.

KJELDTSEN, P, BARLAZ M.A, ROOKER A.P, BAUN, A, LEDIN, A, CHRISTENSEN T.H. Present and long-term composition of MSW landfill leachate: a review, Crit. Rev. **Environ. Sci. Technology** ., v. 32, p. 297–336, 2002.

KHAN, M., YOSHIDA, N., Effect of L-glutamic acid on the growth and ammonium removal from ammonium solution and natural wastewater by *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**. v. 99, p. 575-582, 2008.

KHANZADA, Z.T.; ÖVEZ, S. Growing fresh water microalgae in high ammonium landfill leachate. **American Journal of Mechanics and Applications**, v.6, p. 50-61, 2018.

MARTINEZ, F.; RODRIGUES M.L.; ROSALES, M.D.F.; MEDINA, M.; MARTINEZ, C.U.; ROLDAN, A.J. Tolerance and nutrients consumption of *Chlorella vulgaris* growing in mineral medium and real wastewater under laboratory conditions. **Open agriculture**, v.2 n.1 p. 394-400, 2017.

MOJIRI, A.; ZIYANG, L.; HUI, W.; AHMAD, Z.; TAJUDDIN, R.M.; ABU, S.S.; AMR, KINDAICHI, T.; AZIZ, H.A.; FARRAJI, H. Concentrated landfill leachate treatment with a combined system including electro-ozonation and composite adsorbent augmented sequencing batch reactorprocess, **Process Saf. Environ**. v. 111, p. 253–262, 2017.

MUNOZ, R & GUIEYSSE, B. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. **Water Resource**, v.40, p. 2799-2815, 2006.

OLIVEIRA, E.G. Identificação de compostos orgânicos e avaliação da toxicidade de lixiviado de aterro sanitário tratado por Fenton. Tese de Doutorado. **UEPB- Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental**, 2019.

OULEGO, P.; COLLADO, S.; LACA, A.; DIAZ, M. Impact of leachate composition on the advanced oxidation treatment. **Water Research**, n° 8, p. 389-402, 2016.

PASKULIAKOVA, A.; TONRY, S.; TOUZET, N. Phycoremediation of landfill leachate with chlorophytes: phosphate alimiting factor on ammonia nitrogen removal, **Water Resource**, v. 99 p.180–187, 2016.

PAVASANT, P.; APIRATIKUL, R., SUNGKHUM, V., SUTHIPARINYANONT, P., WATTANACHIRA, S & MARHABA, T. F. Biosorption of Cu²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺, and Zn²⁺ using dried marine green macroalga *Caulerpa lentillifera*. **Bioresource technology**, v. 97, p. 2321-2329, 2006.

PROCHÁZKOVÁ, G.; BRÁNYIKOVÁ, I.; ZACHLEDER, V.; BRÁNYIK, T. Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. **Journal Applied Phycology**, v. 26, p. 1359–1377, 2014.

RAWAT, I.; RANJITH KUMAR, R.; MUTANDA, T.; BUX, F. Biodiesel from microalgae: a critical evaluation from laboratory to large-scale production. **Applied Energy**, v.103, p. 444-467, 2013.

RICHMOND, A., Handbook of microalgal mass culture, Boston: **CRC Press**, p.156-177, 304-306, 1990.

SFORZA, E.; KHAIRALLAHALEMARA, M.H.; SHARIF, A.; BERTUCCO, A. Exploitation of urban landfill leachate as nutrient source for microalgal biomass production. **Chem. Eng. Trans.**, v. 43, p.373–37, 2015.

TAGLIAFERRO, G.V.; FILHO, H.J.I.; CHANDEL, A.K.; SILVA, S.S.; SILVA, M.B.; SANTOS, J.C. Continuous cultivation of *Chlorella minutissima* 26a in landfill leachate-based medium using concentric tube airlift photobioreactor. **Algal Research**, v. 41, 101549, 2019.

TAVARES, L. H. S.; ROCHA, O. Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos. São Carlos. **Rima**, 105p., 2003.

UTERMÖHL, H. Zur Vervollkommung der quantitativen phytoplankton methodik. **MitteilungenInternationale Vereinigung fur Theoretische und Angewandte Limnologie** v. 9, p.1-38, 1958.

ZAGATTO, P.A & ARAGÃO, M.A. Implantação de métodos para avaliação de algas tóxicas. São Paulo. **Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB)**. Relatório Técnico. 23p., 1992.

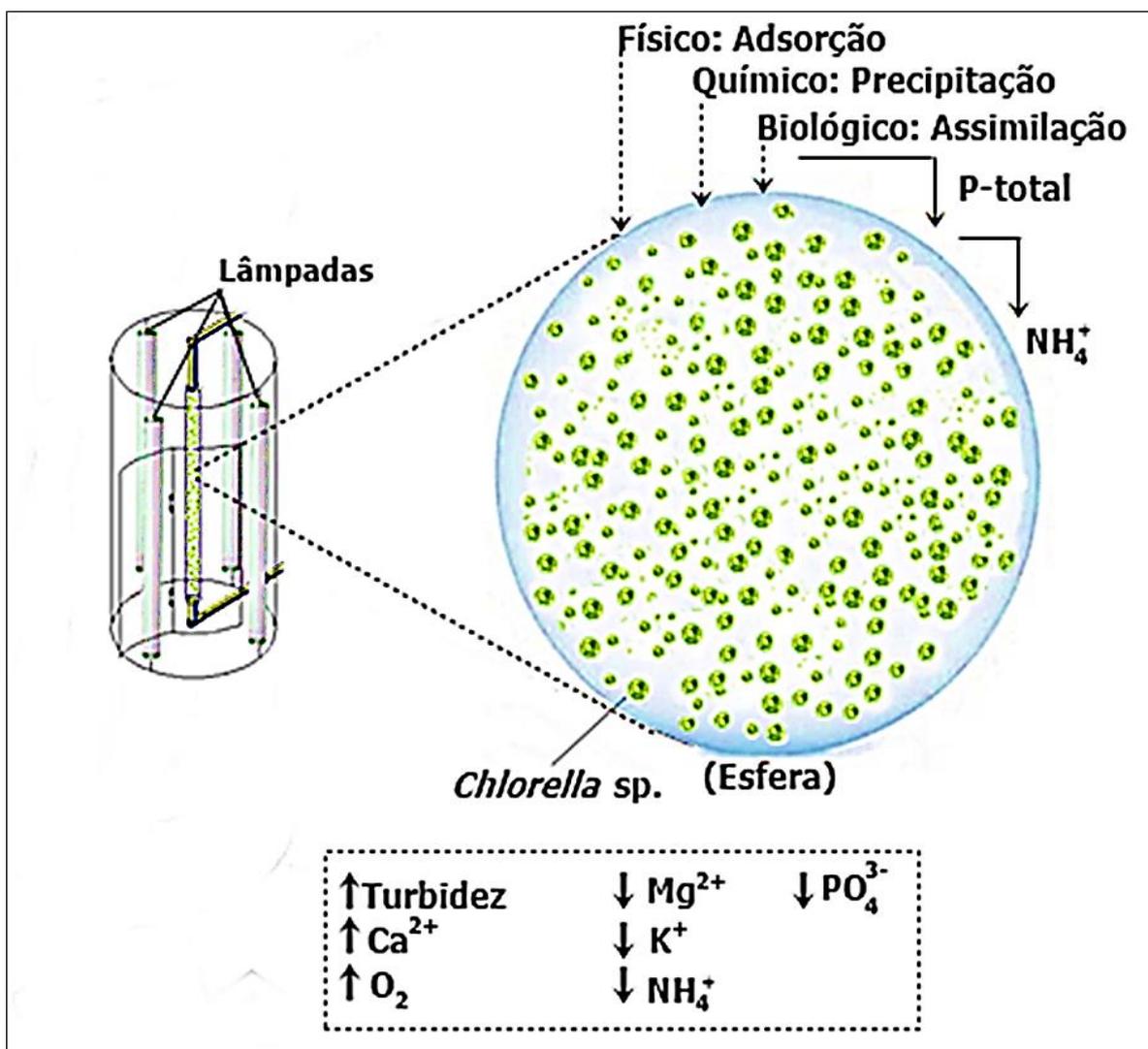
ZHAO, X.; ZHOU, Y.; HUANG, S.; QIU, D.; SCHIDEMAN, L.; CHAI, X.; ZHAO, Y. Characterization of microalgae-bacteria consortium cultured in landfill leachate for carbon fixation and lipid production, **Bioresource Technology**, v. 156, p. 322–328, 2014.

CAPÍTULO 5

REMOÇÃO DE NUTRIENTES DE LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO APLICANDO *Chlorella* sp. IMOBILIZADA EM BIORREATOR ALIMENTADO EM REGIME CONTÍNUO

Figure Abstract

Sistema contínuo com *Chlorella* sp. imobilizada em alginato de cálcio, com destaque para os mecanismos de remoção de nutrientes nos sistemas imobilizados



Fonte: Autora (2020)

RESUMO

O Lixiviado de aterro sanitário é um resíduo líquido que apresenta elevada magnitude de matéria carbonácea e nitrogenada, esta segunda, em forma de nitrogênio amoniacal, além de, metais pesados, fósforo e componentes químicos recalcitrantes. Sendo, desta forma, uma água residuária de alto poder poluente para os ecossistemas. Esta pesquisa avaliou a remoção de nutrientes de lixiviado de aterro sanitário aplicando *Chlorella* sp. imobilizada em alginato de cálcio. O lixiviado foi coletado no aterro sanitário metropolitano de João Pessoa (ASMJP). A cepa da *Chlorella* sp. foi isolada do sistema de lagoas de tratamento de lixiviado, cultivada em Meio Basal de Bold em regime de batelada e posteriormente imobilizada em alginato de cálcio a 4%. Foi monitorado um biorreator tubular alimentado em regime contínuo, com capacidade de 92,7 mL, vazão de recirculação de 80 mL. min⁻¹, temperatura de 29°C, TDH de 2h, recheado com esferas de alginato com *Chlorella* sp. imobilizada com 4 mm de diâmetro médio. Os parâmetros avaliados foram pH, Turbidez, O.D, P-Total, N- amoniacal, íons e as microanálises de MEV (microscopia Eletrônica de Varredura) e EDS (Espectroscopia por Energia Dispersiva) O biorreator com *Chlorella* sp. imobilizada (BAI) apresentou remoção de 41% de N- amoniacal no 1^o ensaio de cada bloco experimental em concentrações afluentes médias de 96 mg.L⁻¹ em comparação com o biorreator controle (BC) que removeu 12%. O incremento médio de Turbidez registrado no BAI foi de 668%, sugerindo desestruturação da matriz. O oxigênio dissolvido aumentou em até 41% durante a monitoração. A análise de MEV da superfície das esferas indicam que a matriz apresenta porosidade e que confina as células em seu interior. Os resultados de EDS apontam para a incorporação dos oligoelementos Si, Ca, Cl, O, S, C, Na e Hg na esfera. Não foram registradas diferenças de remoção de N- amoniacal com adição de suplementação fosfática no substrato. Foram registradas remoções médias de P-Total de 63% no BAI, com concentrações afluentes médias de 0,81 mg.L⁻¹ e com incremento de 0,6 unidades de pH, para remoção de média de 31% no BC. Em todos os volumes de recheios com concentrações afluentes de N-amoniacal entre 48 e 103 mg.L⁻¹ foram registradas remoções entre 37 e 57%. A análise dos dados do planejamento BB DOE Full 3⁽²⁻⁰⁾ para um nível de confiança de 95% indicaram que o volume de esferas e a concentração afluyente de N- amoniacal exerceram efeito estatístico significativo na remoção desse no sistema, contudo, em níveis de entrada de 50 mg L⁻¹ de N-amoniacal, o volume de 40 ml de esfera é suficiente para uma remoção de 68%. Todavia, para concentrações acima de 50 mg.L⁻¹, o volume de esferas deve ser elevado gradativamente. Os resultados desta pesquisa sugerem que a bioassimilação (célula) e adsorção (alginato) foram os mecanismos que explicam a remoção de N-amoniacal e P-Total no sistema. Apontam desta forma, para o potencial fitorremediativo da *Chlorella* sp. imobilizada na remoção de nutrientes de lixiviado de aterro sanitário promovendo a recuperação de recursos com a obtenção de uma água residuária com melhor qualidade sanitária.

Palavras Chave: Fitorremediação; Remoção de N-amoniacal; Remoção de fósforo; Algas imobilizadas; Chorume.

ABSTRACT

Landfill leachate is a liquid waste that has a high magnitude of carbonaceous and nitrogenous matter, the latter in the form of ammoniacal nitrogen, in addition to heavy metals, phosphorus and recalcitrant chemical components. Thus, it is a waste water of high polluting power for ecosystems. This research evaluated the removal of nutrients from landfill leachate by applying *Chlorella* sp. immobilized in calcium alginate. The leachate was collected at the João Pessoa metropolitan landfill (ASMJP). The strain of *Chlorella* sp. was isolated from the leachate treatment pond system, grown in Bold Basal Medium in batch mode and subsequently immobilized in 4% calcium alginate. A tubular bioreactor fed in a continuous regime, with a capacity of 92.7 mL, with a recirculation flow of 80 mL, was monitored. min^{-1} , temperature of 29°C, TDH of 2h, filled with alginate spheres with *Chlorella* sp. immobilized with an average diameter of 4 mm. The parameters evaluated were pH, Turbidity, O.D, P-Total, N-ammoniacal, ions and the microanalysis of SEM (Scanning Electron Microscopy) and EDS (Dispersive Energy Spectroscopy) The bioreactor with *Chlorella* sp. immobilized (BAI) showed 41% removal of N-ammoniacal in the 10 test of each experimental block in average affluent concentrations of 96 mg.L^{-1} in comparison with the control bioreactor (BC) which removed 12%. The average increase in Turbidity registered at BAI was 668%, suggesting a breakdown of the matrix. Dissolved oxygen increased by up to 41% during monitoring. SEM analysis of the surface of the spheres indicates that the matrix has porosity and that it confines the cells within it. The EDS results point to the incorporation of the trace elements Si, Ca, Cl, O, S, C, Na and Hg in the sphere. There were no differences in the removal of N-ammonia with the addition of phosphate supplementation in the substrate. Average P-Total removals of 63% were recorded in BAI, with average affluent concentrations of 0.81 mg.L^{-1} with an increase of 0.6 pH units, for removal of an average of 31% in BC. In all volumes of fillings with affluent concentrations of N-ammonia between 48 and 103 mg.L^{-1} , removals between 37 and 57% were recorded. The analysis of the BB DOE Full 3 ⁽²⁻⁰⁾ planning data to a 95% confidence level indicated that the volume of spheres and the affluent concentration of N-ammonia had a significant statistical effect in removing this in the system, however, in entry levels of 50 mg.L^{-1} of N-ammonia, the volume of 40 ml of sphere is sufficient for a 68% removal. However, for concentrations above 50 mg.L^{-1} , the volume of beads should be increased gradually. The results of this research suggest that bioassimilation (cell) and adsorption (alginate) were the mechanisms that explain the removal of N-ammonia and P-Total in the system. In this way, they point to the potential phytoremediation of *Chlorella* sp. immobilized in the removal of nutrients from leachate from sanitary landfills promoting the recovery of resources by obtaining waste water with better sanitary quality.

Keywords: Phytoremediation; Removal of N-ammoniacal; Phosphorus removal; Immobilized algae; Slurry.

5.1. INTRODUÇÃO

A aplicação de microalgas no tratamento de águas residuárias tem sido investigada há várias décadas, contudo, pesquisas sobre a utilização destes microrganismos na remediação de lixiviados de aterros sanitários são muito recentes (RICHARDS & MULLINS 2013; ZHAO et al., 2014). A viabilidade de cultivar microalgas em diferentes tipos de águas residuárias para produzir simultaneamente biomassa e remover nutrientes foi relatada em vários estudos (JEBALI et al., 2018; MIHSRA et al. 2018; PASKULIAKOVA et al., 2018).

Em trabalho desenvolvido por Silva et al. (2018), monitorando um biorreator alimentado em regime de batelada com TDH de 240 horas, aplicando 16 cepas de microalgas no tratamento de lixiviado de aterro sanitário foram obtidas remoções de 80% e 98% para nitrogênio amoniacal e magnésio respectivamente, com elevação do pH e aumento na concentração de oxigênio dissolvido. A remoção de fósforo total em foi em torno de 65% em 96 horas de monitoração.

É importante destacar que o tamanho pequeno de células isoladas representa um problema na aplicação de processos biotecnológicos para esses organismos, dificultando a retenção das mesmas no interior dos biorreatores. Segundo Kaparapu (2017), para resolver esses problemas, as técnicas de imobilização celular foram ampliadas.

A imobilização consiste na retenção de células ou enzimas em uma estrutura física insolúvel, que as obriga a permanecerem em uma região particular do biorreator. A imobilização de microrganismos na forma de biofilmes, flocos e pellets é um fenômeno comum na natureza (PRADELLA, 2001). O alginato de sódio é preferencialmente a matriz polimérica usada para imobilização de microalgas devido à sua elevada difusividade, baixa toxicidade e alta transparência (MORENO-GARRIDO, 2008; ZAMANI et al., 2012) possibilitando a proteção das células contra predadores.

À luz de Kaparapu (2017), os sistemas de algas imobilizadas são relativamente fáceis de monitorar em larga escala, pois, estes foram usados por indústrias produtoras de compostos por muito tempo. Esses sistemas não produzem riscos para a saúde, são pouco impactantes ao meio ambiente, não produzem poluição secundária e seus produtos finais podem ser convertidos em subprodutos adicionais (como fertilizantes ou biocombustíveis) contribuindo para a redução dos custos.

Em estudo de Filippino et al. (2015) foi demonstrado o desempenho de microalgas imobilizadas para um sistema contínuo de tratamento de PO_4^{3-} com um máximo concentração entre 0,4 e 1,8 mg. L^{-1} , com uma remediação de 60 a 100% em um teste de TDH de 12 horas e 0 a 40% em TDH de 6,5 horas sob diferentes condições de iluminação e adição de CO_2 . As microalgas imobilizadas assimilam o N-amoniaco, para seu metabolismo, e, através da fotossíntese, promovem condições ambientais, para que se desenvolvam outros mecanismos de remoção química, a exemplo da sorção (SILVA et al., 2019).

Assim, o lixiviado de aterro sanitário é originado basicamente da fração de água de chuva infiltrada na célula do aterro e da água presente na massa de resíduos aterrados. As características qualitativas e quantitativas do lixiviado gerado em aterro sanitário dependem diretamente da composição física e química dos resíduos destinados aos aterros sanitários, da compactação da massa dos resíduos nas células dos aterros, dos fatores climáticos e de determinados parâmetros operacionais (LEITE et al., 2011).

A composição dos lixiviados de aterro depende dos constituintes dos resíduos aterrados, características do solo, padrão de precipitação e idade do aterro. No entanto, a maioria dos lixiviados possui a mesma composição básica caracterizada por quatro componentes principais: matéria orgânica dissolvida, CH_4 , ácidos graxos voláteis e alguns compostos refratários, como ácidos fúlvicos e húmicos, componentes macro inorgânicos (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^-), metais pesados e compostos orgânicos xenobióticos, como hidrocarbonetos aromáticos, fenóis e compostos alifáticos clorados (NAVEEN et al., 2016).

Ademais, o alto nível de nitrogênio amoniaco do lixiviado é considerado o principal fator causador de toxicidade e inibição da atividade das microalgas (DE CASTRO et al. 2017). O nitrogênio é o principal constituinte de proteínas, hormônios, moléculas de transferência de energia, construção de material genético, clorofila e enzimas envolvidas na fotossíntese. É responsável por 1-10% de biomassa seca e sua disponibilidade afeta a fotossíntese de microalgas (JIA & YUAN, 2016). Esta água residuária, quando descartada sem tratamento prévio, acarreta impactos negativos ao ambiente, a citar: contaminação da biocenose em geral, poluição do solo, poluição do ar através da liberação de gás amônio, eutrofização (enriquecimento) dos mananciais com conseqüente bloom das microalgas e redução do oxigênio dissolvido dos corpos aquáticos.

O estudo da inserção de microalgas no tratamento das águas residuárias, ao que denomina-se fitorremediação, tem sido ampliado pelas vantagens adicionais que estes sistemas apresentam em relação à outros tratamentos facilidade de monitoração dos sistemas. Algumas microalgas são específicas quanto aos aminoácidos que são capazes de transportar para o meio

intracelular, contudo, as espécies do gênero *Chlorella* são, geralmente mais versáteis quanto às suas capacidades de transporte de aminoácidos, sendo este um motivo para sua aplicação (KIRK & KIRK 1978a; SAUER et al., 1983; SAUER, 1984).

Deste modo, o uso de sistemas de algas imobilizadas tendo em vista a remoção de nutrientes de águas residuárias, é uma tecnologia que apresenta vantagens a exemplo do uso de pequenas áreas e não requisitar produtos químicos, a exemplo dos sistemas de microalgas suspensas.

Diante do exposto, esta pesquisa visou investigar a eficiência da *Chlorella* sp. imobilizada em matriz de alginato no tratamento de lixiviado de aterro sanitário em fotobiorreator alimentado em regime contínuo.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Considerações Gerais

Esta pesquisa foi desenvolvido nas dependências físicas da Estação Experimental de Tratamento Biológico de Esgotos Sanitários (EXTRABES), pertencente à Universidade Estadual da Paraíba, situada no bairro do Tambor, na cidade de Campina Grande – PB. O período de execução foi do mês de Abril/2019 a Dezembro/2019. O lixiviado de aterro sanitário (LAS) foi coletado na entrada do sistema de lagoas de tratamento do lixiviado, acondicionado em galões de polietileno de 50 litros, transportado até o laboratório da EXTRABES para posteriormente ser caracterizado física e quimicamente. O aterro sanitário está localizado no Engenho Mussuré, Distrito Industrial, a 5 km da BR-101 na região metropolitana da cidade de João Pessoa – PB.

As amostras de lixiviado para estudo do fitoplâncton foram coletadas na entrada e saída de cada lagoa do sistema de tratamento lixiviado do aterro sanitário da cidade de João Pessoa (L₁ = decantação, L₂ = anaeróbia I, L₃ = anaeróbia II, L₄ = facultativa aerada e L₅ = recirculação), acondicionadas em garrafas de polietileno de 2 L, fixadas em lugol acético na concentração final de 4%, mantidas a 4°C, preservadas da luz.

Identificação

Para identificação do fitoplâncton presente na água residuária, 5 mL de LAS (2,5 afluentes e 2,5 efluentes de cada lagoa) foram transportados para cinco frascos erlenmeyers de 250 mL, contendo cada um, 100 mL de meio ASM-1 estéril, (GORHAM et al. 1964 e ZAGATTO e ARAGÃO, 1992). As amostras foram colocadas em mesa agitadora marca ORBITAL sob rotação de 80 rpm, temperatura de 30°C e fotoperíodo de 24 horas. Transcorrido o período de 14 dias, visando identificar a espécie dominante, procedeu-se o levantamento fitoplanctônico em microscópios óptico (espécies esféricas) e invertido (espécies filamentosas) da marca COLEMAN com lente de aumento de 400x. O sistema de classificação para classes e gêneros seguiu recomendações de Bicudo e Menezes (2006), e, para as espécies foram utilizadas chaves de identificação específicas de cada grupo. A contagem do fitoplâncton foi realizada por câmara de Utermöhl capacidade de 2 ml da marca CIENLAB, pelo método da sedimentação de Utermöhl (1958).

5.2.2. Isolamento da espécie dominante

A partir da identificação das espécies foi realizado o isolamento da *Chlorella* sp. pelo método de ágar em placa preconizado por Guerrero III e Villegas (1982). As cepas de *Chlorella* sp. foram inoculadas em placas de Petri, pré-esterilizadas contendo Meio Basal Bold's-MBB (BISCHOFF e BOLD, 1963; BOROWITZKA, 1988) com 1,5% de ágar. As amostras foram mantidas em câmara de cultivo, temperatura de 27°C em fotoperíodo de 24 horas, sob iluminação de 4 lâmpadas fluorescentes, intensidade de fótons de $85 \mu\text{E} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$.

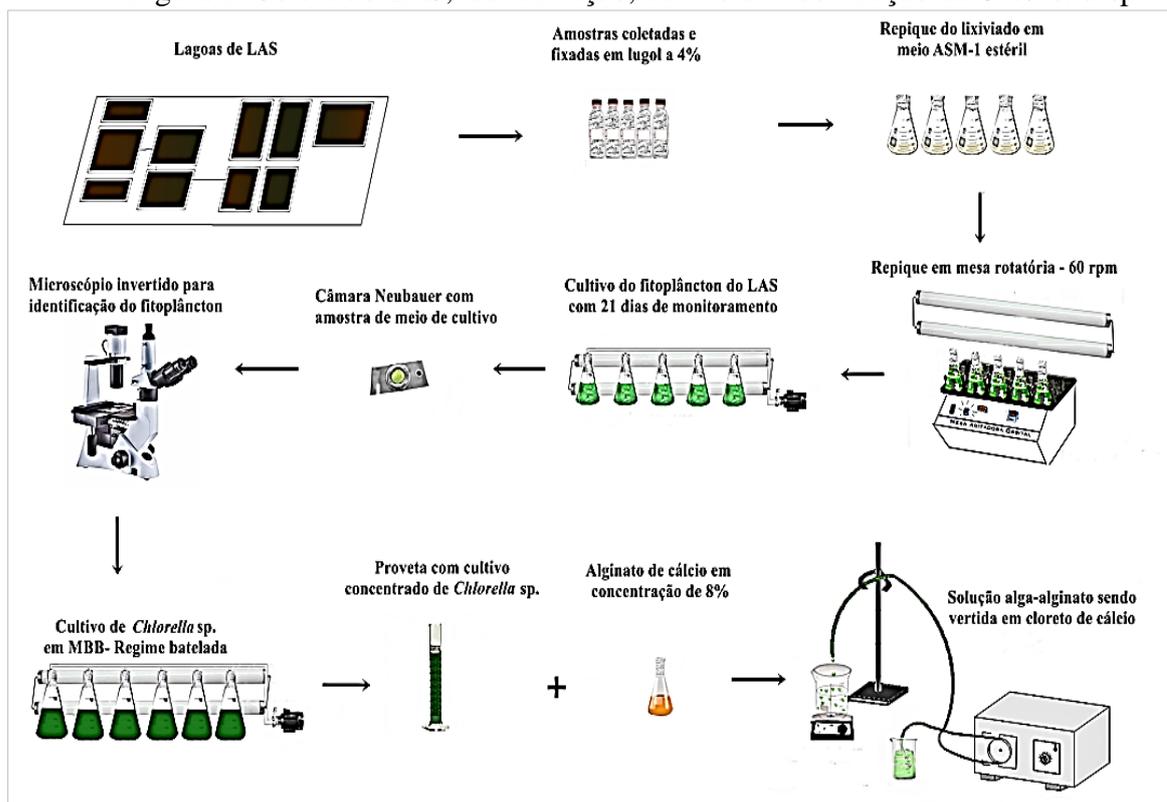
Passados 21 dias, foi realizado o isolamento usando pipeta de Pasteur de vidro. A observação do gênero algal foi procedida em microscópio óptico da marca Coleman em objetiva de 400x, sendo essa amostra unialgal inoculada em frascos erlenmeyer contendo 50 ml de MBB. Aos 21 dias, a cepa foi ressuspensa em 100 mL de MBB e colocada em mesa rotatória com $80 \text{ rev} \cdot \text{min}^{-1}$ em frascos erlenmeyer de 250 mL. Passados 7 dias, 32 mL de meio de cultivo foram ressuspensos em frascos erlenmeyer de 2L contendo 1600mL MBB.

5.2.3. Imobilização

Foi centrifugado 1,0 L de cultivo de células em centrífuga QUIMIS a 3500 rpm por 15 minutos, até o volume concentrado de 100mL de extrato algal, este, foi homogeneizado em solução polimérica de alginato de cálcio a 8% (Aldrich) na proporção 1:1 visando ter um polímero em concentração final de 4%. Posteriormente, a suspensão alga-alginato, foi aduzida através de um tubo de silicone de 100 cm e 4 mm de diâmetro, por uma bomba dosadora peristáltica da marca MILAN, com vazão de $9,8 \text{ ml. min}^{-1}$, distância de 15 cm da solução receptora de CaCl_2 0,3 M(Sigma), mantendo-se sob agitação de 50 rpm em agitador Fanem Modelo 258. Foi obtida uma produção média de 103 esferas. min^{-1} , apresentando diâmetro médio de 4 mm para 84% da amostra preparada.

Concluída a produção, as esferas foram deixadas imersas por 30 minutos na solução receptora (CaCl_2) visando aumentar sua resistência, em seguida procedeu-se a lavagem em água destilada, sendo posteriormente mantidas nesse líquido acondicionadas a 4°C . Foram preparadas esferas controle de alginato de cálcio em concentração final de 4% seguindo o processo anteriormente descrito. Na Figura 01 está um esquema das etapas desde a coleta do LAS, identificação, cultivo e imobilização da *Chlorella* sp.

Figura 1. Coleta do LAS, identificação, cultivo e imobilização da *Chlorella* sp.



Fonte: Autora (2020)

5.2.4. Monitoração do sistema

Foi projetado um biorreator tubular em quartzo que possuía 29,5 cm de comprimento, 20 mm de diâmetro, tendo 3 cm de fibra de vidro sob material de recheio, mantido sob iluminação de 4 lâmpadas fluorescentes da marca ECOLUMÉ de 16 Watts. O sistema foi conectado a uma bomba NEMO dosadora NM Micro da marca NETZSCH, controlada por conversor de frequência MOVITRAC LTE-B, mangueira de 20 mm de diâmetro e um tanque de equalização de 30 cm de altura e 48 cm de circunferência. Para todas as etapas, o substrato de alimentação foi lixiviado diluído em água destilada. Foi preparada uma alíquota de 1000 mL (aproximadamente 13600 esferas) com *Chlorella* sp. imobilizada em alginato a 4% e, uma alíquota de 500 mL de esferas controle constituídas de alginato de cálcio em concentração final de 4%.

O ensaio era iniciado com a preparação de 1L de substrato, foi utilizado H₂SO₄ 5N para neutralização do pH, separação de 500 mL (amostra T₀) e, alimentação do tanque de equalização (reservatório de PVC) com 500mL da fração restante. O regime de alimentação foi contínuo e ascensional com vazão de recirculação de 80 mL/min⁻¹, de forma que quando o substrato passava entre as esferas promovia seu revolvimento gradual tornando o leito fluidizado.

Transcorridas 2(duas) horas de monitoramento, o biorreator era esvaziado para análise do efluente, desconectado do sistema, envolvido com papel alumínio e, mantido na horizontal em temperatura de 27°C até a realização do próximo ensaio com o mesmo recheio. Na Tabela 1 estão apresentados os parâmetros monitorados e a configuração do biorreator.

Tabela 1. Parâmetros monitorados e configuração do sistema.

| CONFIGURAÇÃO | DESCRIÇÃO |
|---|------------------------|
| 1- Capacidade(mL) | 92,7 |
| 2- Volume útil(mL) | 38 |
| 3- Volumes do recheio (mL) | 50, 75, 100, 110 e 130 |
| 4- Volume do substrato tratado (mL) | 500 |
| 5- Quantidade de esferas por mL | 13,6 |
| 6- Regime de alimentação | Contínuo |
| 7- Temperatura | 29° C |
| 8- Vazão de recirculação(mL.min ⁻¹) | 80 |
| 9- Intensidade de fótons (μE.s ⁻¹ .m ⁻²) | 85 |

A pesquisa foi realizada em três etapas e as análises dos parâmetros foram conduzidas em duplicata. Na Tabela 2 estão apresentadas as características operacionais e parâmetros avaliados do sistema em cada etapa da pesquisa.

Tabela 2. Características operacionais e parâmetros avaliados do sistema em cada etapa da pesquisa.

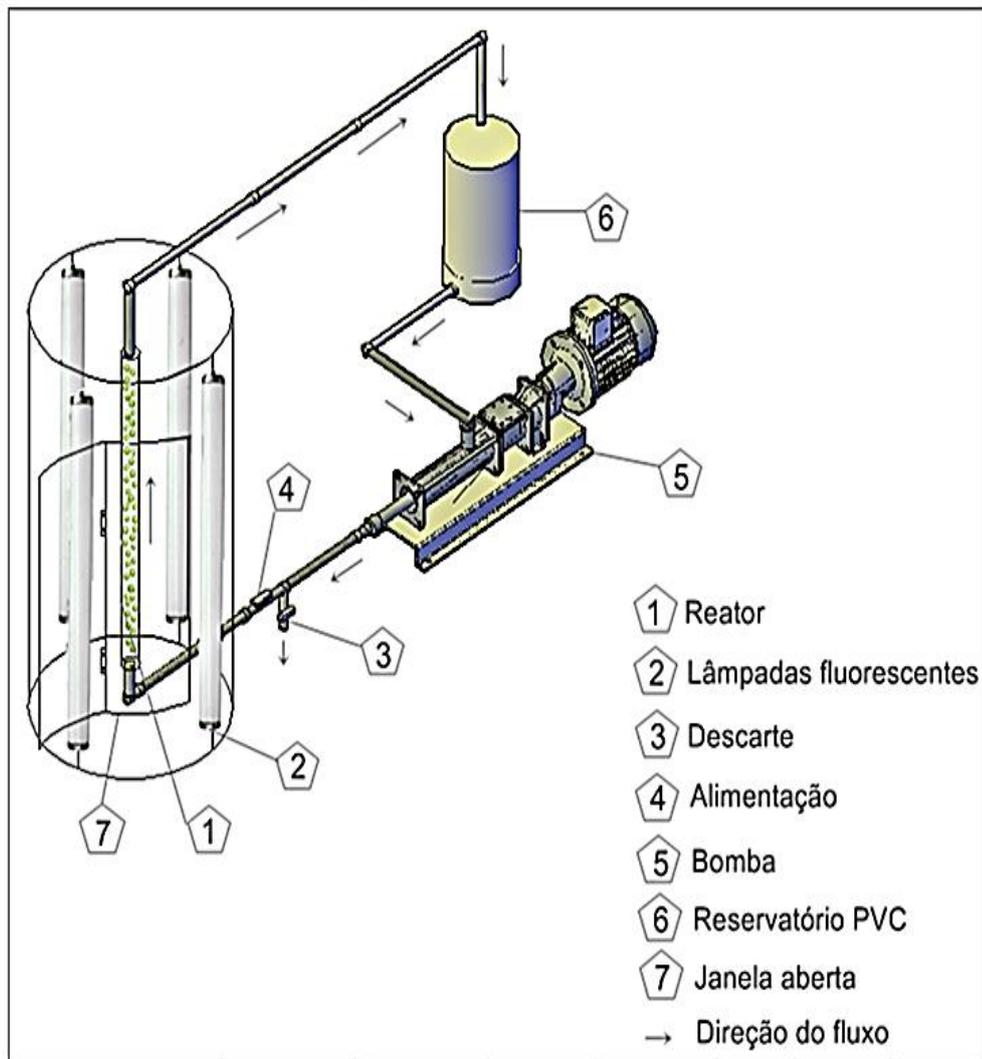
| Configuração | Etapa I | Etapa II | Etapa III |
|---|--|-------------------------------------|---------------------|
| TDH (h) | 2 | 2 | 2 e 3 |
| Volumes de Recheio (mL) | 100 | 100 | 50,75,100,110 e 130 |
| N- Amoniacal Afluente (mg.L ⁻¹) | 96 | 82 | 50 a 85 |
| Parâmetros Avaliados | pH, Turbidez, N-amoniacal, O.D, P-Total, íons, MEV e EDS | pH, Turbidez, N-amoniacal e P-Total | pH e N- amoniacal |

5.2.4.1. Etapa I- Remoção de Nutrientes em Concentração de N-amoniacal Afluente controlada

Foram conduzidos 5 ensaios consecutivos em BAI (biorreator com algas imobilizadas) com intervalo de 48 horas entre eles, o substrato de alimentação foi LAS diluído em água destilada com razão N:P=118, concentração afluente média de N-amoniacal de 96 mg.L⁻¹, volume de recheio adotado de 100mL e TDH de 2h. Ao término de cada ensaio, o BAI foi desconectado do sistema e o outro tubo de quartzo contendo as esferas controle foi conectado para realização do teste em iguais condições operacionais.

Após diluição do LAS, o pH de entrada foi ajustado para as faixas entre 6,0 e 7,0 unidades usando H₂SO₄ 5N. Os efluentes foram avaliados para pH, Oxigênio Dissolvido, Turbidez, N-amoniacal, P-Total e íons. Visando a avaliação da integridade e porosidade das esferas, a composição química e a localização das células de *Chlorella* sp. na matriz imobilizante, procedeu-se as microanálises de MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura) por metodologia de elétrons primários em aparelho TM-1000 (Tabletop Microscope) da marca Hitachi e ainda de EDS (Espectroscopia por Energia Dispersiva), realizada em aparelho BRUKER AXS (Microanalysis GmbH) acoplado ao MEV e interpretado pelo programa QUANTAX-50. As microanálises foram realizadas no CERTBIO - Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste- UFCG- Campus I. Na Figura 2 está apresentado o biorreator monitorado durante o estudo.

Figura 2. Biorreator com algas imobilizadas alimentado em regime contínuo



Fonte: Autora (2020)

Ao término de cada ensaio, o tubo de quartzo contendo as esferas com algas imobilizadas foi desconectado do sistema, protegidas da luz e mantidas em sentido horizontal a 27° C até realização do ensaio subsequente.

5.2.4.2. Etapa II - Remoção de Nutrientes com e sem adição de fosfato no substrato

Foram monitorados um BAI e um BC recheados com 100 mL de esferas em TDH de 2h para a realização de 6 ensaios com intervalo de 48h. O pH do substrato foi ajustado em todos os ensaios para valores entre 6,0 e 7,0, utilizando-se H₂SO₄ 5N. Nessa etapa, buscou-se investigar se a suplementação fosfática no substrato tornaria mais eficiente a remoção de N-amoniacoal pela *Chlorella* sp. imobilizada. Ao término de cada ensaio sem suplementação de

fosfato no substrato (aproximadamente 0,5 mg. P.L⁻¹ afluente) o sistema foi esvaziado, o biorreator foi desconectado, protegido da luz e mantido em sentido horizontal a 27°C até realização do ensaio subsequente. Outro biorreator foi conectado para realização do ensaio com suplementação de fosfato no substrato (4,9 a 6,5 mg.P.L⁻¹). Os efluentes foram avaliados para pH, Turbidez, N-amoniacoal e P-total.

5.2.4.3. Etapa III - Remoção de N- amoniacoal em diferentes volumes de recheio

Foram executados 5 ensaios consecutivos com cada um dos seguintes volumes de recheios (algas imobilizadas): 50, 75, 100, 110 e 130 mL com intervalo de 48h entre eles, TDH de 2h, com ajuste de pH de entrada para 6,0 e 7,0 e intensidade de fótons de 85 $\mu\text{E} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$. Após o 5º ensaio de cada volume testado, as esferas foram retiradas do biorreator, com subsequente lavagem da tubulação de todo o sistema usando 1 L de água destilada recirculando por 5 minutos. Realizou-se o descarte da água de lavagem e subsequente preenchimento com o novo volume de recheio à ser trabalhado. Esse procedimento foi repetido até testagem do volume de 130 mL. Os efluentes coletados foram avaliados quanto ao pH e N- amoniacoal.

5.2.5. Métodos analíticos aplicados

Os parâmetros de caracterização do lixiviado e seus respectivos métodos analíticos seguiram o que está preconizado em APHA (2012). Para alcalinidade total adotou-se (BUCHAUER, 1998) e Ácidos graxos voláteis, a metodologia adotada foi (KAPP, 1984). Para a pesquisa de íons, a amostra de lixiviado foi filtrada em membrana de fibra de vidro de 0,45 μm , seguida de 0,22 μm e conduzida para cromatógrafo iônico Dionex ICS-1100 da marca Thermo Scientific. Os equipamentos e métodos empregados na avaliação do pH, turbidez, fósforo total, Ortofosfato, amônia, NTK, ST e suas frações, temperatura e íons estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros monitorados, métodos e equipamentos

| Parâmetro | Método (APHA, 2012) | Equipamento(marca/modelo) |
|---------------|---|---|
| pH | Eletrométrico 4500 B | HANNA Instrumentos/HI2300 |
| Turbidez | Nefelométrico 2130 B | MS TECNOPON TB1000P |
| Fósforo total | 4500-P-C | FEMTO 700 Plus- |
| Ortofosfato, | 4500-P-B | FEMTO 700 Plus- |
| Amônia | 4500-NH ₃ | TECNAL- TE-0363 |
| NTK | 4500-N _{org} | TECNAL/TE-0364 |
| SST | 2540 D | QUIMIS/Q334M |
| Temperatura | Eletrométrico 4500 G | HANNA Instrumentos/HI2221 |
| Cátions | Grupo funcional CARBOXYLIC/PHOSPHONIC ACID, hidrofobicidade média-baixa. | Cromatógrafo iônico Dionex ICS-1100 da Thermo Scientific acoplado ao amostrador automático Dionex AS-DV |
| Ânions | Grupo funcional ALKYL/ALKANOL QUATERNARY AMMONIUM, hidrofobicidade baixa. | Cromatógrafo iônico Dionex ICS-1100 da Thermo Scientific |

5.2.6. Estatística

Para os dados da etapa III foi empregado um planejamento experimental do tipo fatorial box Behnken (BB DOE Full) $3^{(2-0)}$, que resultou em 9 diferentes condições experimentais, que foram executadas com uma replicata experimental para os testes com diferentes volumes de recheios (50, 75 e 110 mL).

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pH do lixiviado do lixiviado do ASMJP esteve na faixa de 8,0, favorecendo desta forma, a maior concentração de amônia ionizada (em torno de 94 % de NH₄⁺) em relação à amônia livre (aproximadamente 6% de NH₃) sendo esta última mais tóxica para as microalgas e o NH₄⁺ a forma preferencial de nitrogênio das microalgas.

As concentrações de N-amoniaco no lixiviado do ASMJP oscilaram entre 2514 a 2806 mg. L⁻¹ durante o período de monitoramento e não tem sofrido grandes variações nos últimos 4 anos. Sonawane et al. (2017), pontuam que a composição do lixiviado de aterro varia dependendo do componente do RSU e condições de operação do aterro, todavia, o lixiviado

mantém normalmente um perfil de apresentar elevadas magnitudes de turbidez, nitrogênio amoniacal e matéria orgânica recalcitrante.

Em estudo desenvolvido por OLIVEIRA (2013), avaliando as concentrações de N-amoniacoal e o grau de biodegradabilidade do lixiviado do ASMJP, foram registradas magnitudes de 2177 mg. L⁻¹ de N-amoniacoal e relação (DBO₅/DQO = 0,36) sugerindo, pela análise desses parâmetros, dificuldade para o emprego do tratamento biológico do lixiviado. O nitrogênio amoniacoal em elevadas concentrações juntamente com outros parâmetros como alcalinidade, cloretos e matéria orgânica (DQO) pode classificar o lixiviado de aterro sanitário como potencialmente tóxico (PABLOS et al., 2011).

As magnitudes de Ortofosfato (PO₄³⁻) e Magnésio (Mg²⁺) identificadas no LAS foram respectivamente de 13mg.L⁻¹ e 1500 mg.L⁻¹. Estes íons, podem favorecer o processo fotossintético por microalgas, uma vez que os ortofosfatos são assimilados para a produção de ácidos nucleicos (DNA e RNA) e o magnésio pode ser incorporado para a produção de clorofila *a*. Na Tabela 4 está apresentada a caracterização físico-química do Lixiviado do ASMJP-PB.

Tabela 4. Caracterização Físico-química do lixiviado do ASMJP.

| PARÂMETROS | Magnitude |
|---|------------------|
| pH | 8,0 |
| Alcalinidade Total (mg CaCO ₃ L ⁻¹) | 12437 |
| NTK (mg L ⁻¹) | 3386 |
| Nitrogênio Amoniacal (mg L ⁻¹) | 2806 |
| Nitrogênio Orgânico (mg L ⁻¹) | 580 |
| Sólidos Totais (mg L ⁻¹) | 12996 |
| Sólidos Suspensos Voláteis (mg L ⁻¹) | 5430 |
| Sólidos Totais Fixos (mg L ⁻¹) | 3486 |
| Sólidos Suspensos Totais (mg L ⁻¹) | 212 |
| Sólidos Suspensos Voláteis (mg L ⁻¹) | 146 |
| Sólidos Suspensos Fixos (mg L ⁻¹) | 66 |
| Fósforo Total (mg P L ⁻¹) | 17 |
| Ortofosfato (mg P-PO ₄ ³⁻ L ⁻¹) | 13 |
| Ácidos graxos Voláteis(H _{Ac} L ⁻¹) | 933 |
| DQO total (mg O ₂ L ⁻¹) | 5725 |
| DQO solúvel (mg O ₂ L ⁻¹) | 3625 |
| DBO (mg. O ₂ . L ⁻¹) | 972 |
| Cl ⁻ (mg.L ⁻¹) | 4350 |
| Na ⁺ (mg.L ⁻¹) | 2076 |
| Mg ²⁺ (mg.L ⁻¹) | 1500 |
| Ca ²⁺ (mg.L ⁻¹) | 65 |
| K ⁺ (mg.L ⁻¹) | 1650 |

Fonte: Autora (2020)

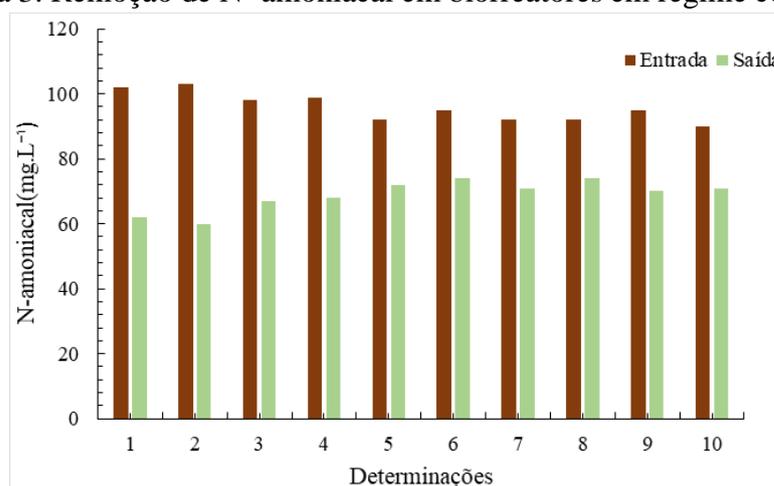
5.3.1. Etapa I: Remoção de nutrientes em função da concentração de N-amoniacoal afluente

Em análise, as algas imobilizadas apresentaram maior eficiência no 1º e 2º ensaios, com remoção média de N-amoniacoal entre 41 e 30% respectivamente, representando uma remoção de massa de N-amoniacoal de 69,44 mg-N, ou seja, uma remoção 55 vezes maior que a massa de fósforo removida durante os 5 ensaios(10h), o N-amoniacoal inicialmente é adsorvido na superfície da matriz, depois penetra na mesma sendo continuamente assimilado pelas células intensificando a coloração verde das esferas sugerindo aumento de biomassa algal, conforme constatado em outros ensaios (dados não mostrados).

O percentual médio de remoção no biorreator controle foi de aproximadamente 12%. A remoção química ocorrida nas esferas controle pode ser explicada, pois, na concepção de Mujtaba et al. (2017), a matriz de alginato possui grupo aniônico (como grupos carboxila), que promove interação iônica com amônio e, portanto, facilita a captação de nitrogênio em sistemas celulares imobilizados.

Nos processos convencionais de tratamentos biológicos, a amônia é removida de águas residuárias através da oxidação de amônio a nitrito e nitrato por bactérias de nitrificação aeróbia. No presente estudo, a redução de N-amoniacoal não resultou no aumento de nitrito ou nitrato, retratando após análise cromatográfica níveis abaixo da faixa de leitura do aparelho em todos os efluentes analisados. A pequena variação no pH atingindo valores máximos de 7,5 afasta a possibilidade de ter ocorrido *Stripping* de amônia, sendo este um processo que ocorre em pH elevado. Na Figura 3 está apresentada a variação temporal da remoção média de N-amoniacoal em BAI em função da concentração afluente.

Figura 3. Remoção de N- amoniacoal em biorreatores em regime contínuo



A Turbidez média de entrada no sistema foi de aproximadamente 4,4 NTU (unidade nefelométrica) recebendo um incremento de 668% no BAI em comparação ao controle que apresentou 492%. A turbidez no sistema aumenta em decorrência da gradativa desestruturação da matriz de alginato de cálcio em resultante do atrito entre as esferas sendo este um sistema de leito fluidizado e ainda, em consequência da concentração de P-total presente no meio reacional

Outro aspecto interveniente no incremento da turbidez é que, sendo usada a mesma batelada de esferas para os 5 ensaios, as microalgas crescem no interior do polímero, elevando a densidade celular e conseqüentemente liberação da biomassa para o substrato. Estes resultados estão consistentes com Whitton et al. 2018, que registraram crescimento da microalga de água doce *Scenedesmus obliquus* imobilizada em alginato de cálcio monitorando um sistema contínuo no tratamento de esgoto doméstico em TDH de 3h.

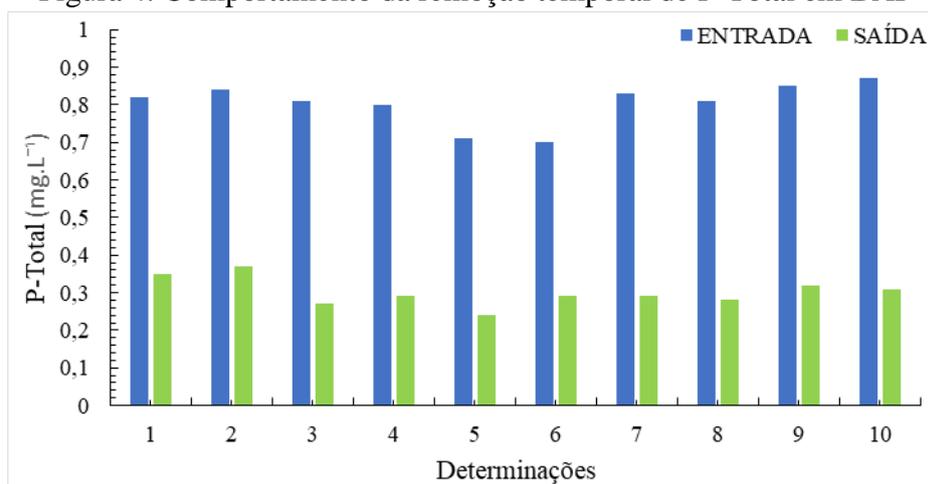
Em destaque, foram registrados incrementos de oxigênio dissolvido entre 18 e 41% em duas horas de monitoração com variação de 0,4 e 0,6 unidades de pH, podendo esse aumento na concentração de oxigênio dissolvido ser um indicativo de que houve atividade fotossintética no interior da esfera, considerando que, durante a fotossíntese, há a liberação de O₂ advindo da fotólise da molécula da água. Em consonância com estes resultados, Mutjaba et al. (2017) monitoraram um fotobiorreator em coluna, recheado com *C. vulgaris* imobilizada em alginato de cálcio e *P. putida* suspensa visando a remoção de nutrientes de água residuária sintética, registraram incrementos de oxigênio dissolvido de até 48% em 5 dias de monitoração.

O reduzido incremento do pH pode estar relacionado com a elevada magnitude da alcalinidade no substrato estudado. Corroborando com este resultado, Leite et al. (2017) pontuam que a alcalinidade em lixiviados é constituída por espécies químicas que podem contribuir para o tamponamento dos processos biológicos de tratamento de resíduos, evitando variações bruscas do pH, situação química bem retratada no lixiviado de aterro sanitário.

5.3.1.1 Remoção de P-Total

Foram obtidas remoções médias de P-Total de aproximadamente 63% no BAI, com concentrações afluentes médias de 0,81 mg.L⁻¹, para remoção de média de 31% no biorreator controle. Este resultado pode ser explicado, pois a remoção de fósforo no sistema pode ocorrer pela via biológica (assimilação pelas algas), por adsorção na matriz de alginato e ainda por precipitação em pH elevado. Na Figura 4 está apresentada variação temporal de P-Total no BAI.

Figura 4. Comportamento da remoção temporal de P-Total em BAI



Corroborando com esses resultados de remoção, Araújo et al. (2017), monitoraram um sistema contínuo com *Chlorella* sp. imobilizada em alginato de cálcio no polimento de efluente secundário clarificado e obtiveram remoções médias de 92% de fósforo total em tempo de contato de 5h.

5.3.1.2. Remoção de Íons

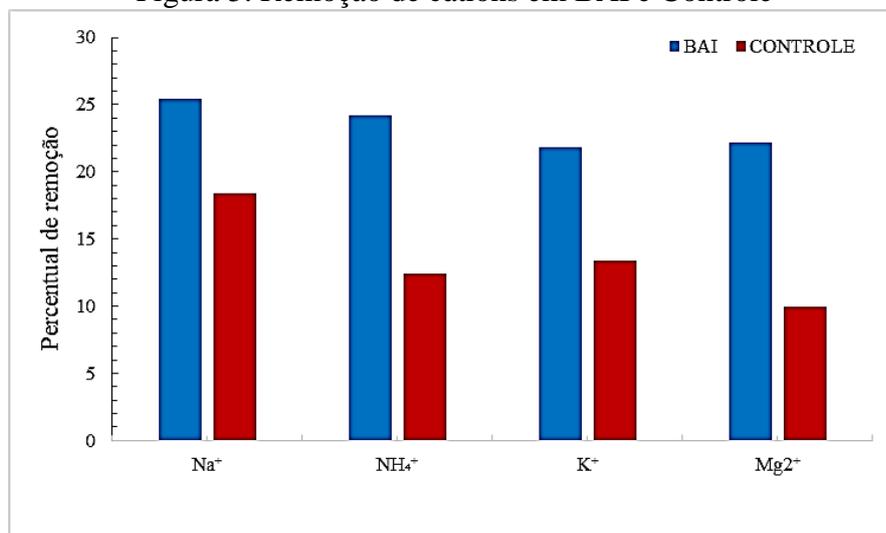
Diversos íons são assimilados pelas microalgas para seu equilíbrio fisiológico, sendo desta forma, importantes na fitorremediação de águas residuárias. Segundo Procházková et al. (2014), para o crescimento das microalgas é necessária uma série de nutrientes, a exemplo de macronutrientes tais como, carbono (C), nitrogênio (N), oxigênio (O), hidrogênio (H) e fósforo (P), além de cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S) e potássio (K).

Destarte, os resultados no BAI para remoção de íons foram mais expressivos que no controle para todos os cátions investigados. Foram obtidas remoções respectivas de NH_4^+ e Mg^{2+} em torno de 33 e 45% no BAI para 18 e 22% no controle. A remoção de magnésio no BAI pode ser explicada, uma vez que, este íon integra a molécula de clorofila *a*, pigmento necessário ao processo fotossintetizante. O Potássio e outros oligoelementos são substâncias essenciais à fisiologia das microalgas, o que se justifica remoções entre 12 e 35% no BAI.

Em estudo desenvolvido por Silva et. al (2018) aplicando 16 cepas isoladas do lixiviado do ASMJP no tratamento de lixiviado com concentrações de N- amoniacal afluentes de 1200 mg.L^{-1} em sistema de microalgas livres alimentado em batelada com TDH de 96 horas, foram

obtidas remoções percentuais de 78, 95 e 88% respectivamente para os íons de K^+ , Ca^{2+} e SO_4^- . Na Figura 5 estão apresentados os valores de remoção de íons no BAI e no Controle.

Figura 5. Remoção de cátions em BAI e Controle



As concentrações médias de Ca^{2+} no efluente do biorreator controle foram sempre maiores do que no BAI para todos os ensaios. O incremento no controle foi de aproximadamente 350% em relação ao BAI, de aproximadamente 256%. Este fato pode ser explicado, pois, no lixiviado de aterro sanitário apresenta uma média de 17 mg.L^{-1} de P-total e, o fósforo atua como um quelante removendo o cálcio presente na esfera, alterando a estrutura física da mesma.

5.3.1.3. MEV e EDS das esferas com algas imobilizadas

A análise de microscopia eletrônica de varredura da superfície das esferas de entrada (antes dos experimentos) indicou esfera íntegra, com porosidade e pequeno número de células de *Chlorella* sp. A análise de espectroscopia por energia dispersiva indicou a presença dos seguintes componentes químicos: Ca, C, F, O e Cl.

Nas esferas após a realização do 5º ensaio foi registrada elevada magnitude de precipitado em formato geométrico sugerindo ser material cerâmico na superfície, identificou-se também, maior número de células de *Chlorella* sp. sugerindo que o polímero já se encontrava

em desestruturação por causas químicas e físicas. A análise de EDS indicou a presença de Si, Cl, Ca, O, S, C, Na e Hg. Na Figura 6 está apresentada a análise de MEV da superfície das esferas de saída no sistema com células na superfície e estruturas cristalizadas que sofreram precipitação e na Figura 7, os resultados de EDS das esferas após os ensaios.

Figura 6. MEV da superfície de esfera apresentando células e estruturas cristalizadas.

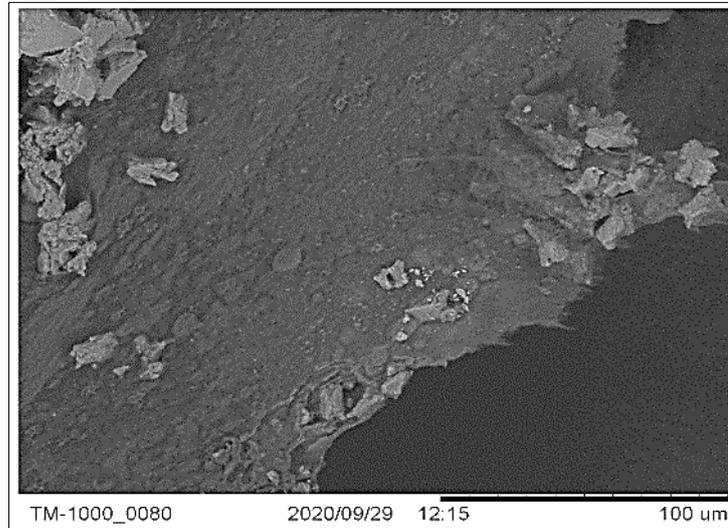
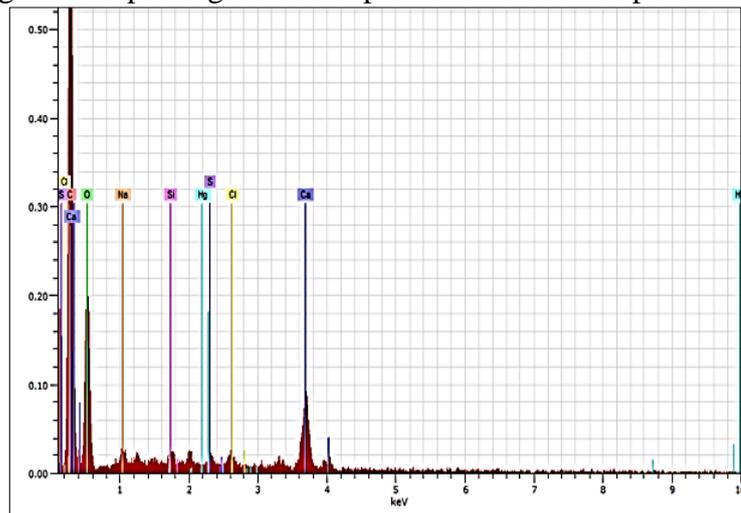


Figura 7. Espectrograma da superfície das esferas após ensaios.



Estes resultados estão em concordância com De-Bashan & Bashan (2010) comprovando que a imobilização em alginato possibilita a troca de matéria entre a célula da *Chlorella* sp. e o substrato removendo NH_4^+ , PO_4^{3-} e outros oligoelementos preservando-a contra contaminação e predadores e constituintes do LAS.

5.3.2. Etapa II - Remoção de nutrientes com e sem adição de suplementação

5.3.2.1. Remoção de N-amoniacal

No ponto de vista de Tett et al. (1985), a razão empírica entre o nitrogênio e o fósforo em microalgas é determinada em 16:1. Neste trabalho, a relação empírica entre N e P do substrato foi 14:1, contudo, as remoções médias variaram entre 24 e 58% no sistema com suplemento fosfático para 27 a 56% para o substrato sem suplemento fosfático e concentração média de N-amoniacal de 82 mg.L⁻¹. A massa média de nitrogênio removida foi 98,7 e 98 mg-N para os sistemas com e sem suplementação respectivamente. Este resultado pode ser explicado, pois, na concepção de Cuellar- Bermudez et al. (2017), a necessidade do equilíbrio estequiométrico é altamente variável entre as espécies de microalgas, sendo este ainda, afetado pelas condições ambientais.

Paskualiakova et al. (2016), cultivaram em sistemas livres, *Clamydomonas* sp., em meio suplementado com fósforo. A microalga promoveu a redução de amônia de 93% e 54% para nitrato do lixiviado de aterro sanitário, indicando a importância da suplementação de fosfato para o equilíbrio químico algáceo, favorecendo ao processo fotossintético. No presente trabalho, aplicando sistemas de microalgas imobilizadas, este equilíbrio estequiométrico pareceu não ter sido muito relevante conforme a análise dos dados em substrato com e sem suplementação de fosfato. Na Tabela 5 estão apresentados os valores médios de remoção de N-amoniacal em sistemas com e sem suplementação de fosfato.

Tabela 5. Valores médios de remoção de nutrientes em ensaios com e sem suplementação

| NH ₄ ⁺ (mg.L ⁻¹) ENTRADA | NH ₄ ⁺ (mg.L ⁻¹) SAÍDA(S)* | NH ₄ ⁺ (mg.L ⁻¹) SAÍDA(NS)** | P-Total(mg.L ⁻¹) ENTRADA(S)* | P-Total(mg.L ⁻¹) ENTRADA(NS)* | P-Total (mg.L ⁻¹) SAÍDA |
|---|---|---|---|--|---|
| 82 | 47 | 54 | 6,4 | 0,5 | 2,0 |
| 85 | 55 | 54 | 4,4 | 0,51 | 2,4 |
| 80 | 58 | 58 | 6,0 | 0,49 | 3,4 |
| 87 | 37 | 38 | 6,5 | 0,53 | 3,3 |
| 80 | 45 | 40 | 6,1 | 0,49 | 2,9 |
| 80 | 54 | 53 | 4,8 | 0,49 | 2,1 |

(S)* - Suplementado (NS)** - Não Suplementado

No presente estudo, o pH inicial para o todo o delineamento experimental foi controlado entre 6,9 e 7,2 portanto, a volatilização do NH_3 pode ser considerada insignificante, o que foi confirmado por estudo anterior (DE GODOS et al. 2009). Foram registrados incrementos de pH que variaram entre 0,3 e 1,0, sugerindo atividade fotossintetizante. A remoção de P-total obtida no tratamento com suplementação, variou entre 45 e 68%. Este resultado pode ser explicado, pois, na concepção de Jimenez-Perez et al. (2004), o fósforo total pode ser removido do sistema com algas imobilizadas através da assimilação algácea para síntese de ácidos nucleicos, por adsorção na matriz de alginato ou mesmo por precipitação no interior das esferas em pH elevado.

No sistema sem suplementação, com concentração afluenta média $0,51 \pm 0,02 \text{ mg.L}^{-1}$ para P-Total, nos quatro primeiros ensaios, obteve-se remoção completa, contudo nos 2 últimos ensaios foi registrada remoção média 90%. Este fato, pode ter ocorrido, pois, sendo os ensaios realizados com a mesma batelada de esferas(recheio), o fósforo presente no lixiviado atua como um quelante, desgastando a matriz e promovendo progressiva liberação de células para o meio. Os resultados obtidos em cada determinação são indicativos de que não existem diferenças de eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal por *Chlorella* sp. imobilizada em alginato de cálcio em sistemas com e sem suplementação de fosfato no substrato.

5.3.2.2. Turbidez

De acordo com os dados de turbidez, no biorreator com suplementação de fosfato foram maiores em comparação ao sem adição para todos os ensaios realizados, apresentando um incremento médio de turbidez de aproximadamente 439% no BAI com suplementação a partir de 1,9 NTU afluentes, para 108% no sistema sem suplementação com 3,3 NTU afluentes. Isto pode ser explicado, pois além do fosfato presente no LAS bruto *in natura* de aproximadamente $13 \text{ mg. P-PO}_4^{3-}.\text{L}^{-1}$, enfatizando, foi realizada a adição de fosfato e este, atua como um quelante na matriz promovendo desgaste da esfera e liberação das células para o substrato.

Silva et al. (2017), em estudo sobre desestruturação da matriz de alginato com *Chlorella* sp. imobilizada, em biorreator com volume de 1L e TDH de 5 horas, tratando efluente de filtro de areia para remoção de fósforo, obtiveram percentual de desgaste de 38,5% em 28 dias de monitoração. Corroborando com esse resultado, Lau et al. (1997) relataram que as concentrações de cálcio encontradas em águas residuárias de biorreatores contendo esferas de

alginato, aumentaram consideravelmente após a realização do experimento. Na Figura 8 estão apresentadas amostras de esferas antes e depois dos ensaios.

Figura 8. Esferas com *Chlorella* sp. Imobilizada antes e ao final dos ensaios.



Fonte: Autora (2020).

5.3.3. Etapa III- Remoção de N-amoniaco em diferentes volumes de Recheio

Percebe-se que os resultados de remoção de N-amoniaco em diferentes volumes de recheio indicaram que entre concentrações afluentes de 48 e 103 mg.L⁻¹ de N-amoniaco com pH de entrada controlado para valores entre 6,2 e 7,4 não apresentaram variações expressivas. Em cada bloco de ensaio com diferentes volumes de recheio foram obtidas as maiores remoções sempre no primeiro ensaio realizado, apresentando remoções entre 37 e 57%. A partir do segundo ensaio de cada bloco a remoção registrada foi menor (variando entre 11 e 44%) e segue em decréscimo até o 5^o ensaio. A possível explicação para este decréscimo na eficiência do sistema é que, a *Chlorella* sp. assimila elevada concentração de N-amoniaco, direciona para as múltiplas aplicações fisiológicas na célula, atingindo um estágio temporário de saturação.

A matriz de planejamento do BB DOE Full 3⁽²⁻⁰⁾ está apresentada na Tabela 6 e os dados dos ensaios com suas respectivas replicatas estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 6- Matriz de planejamento do BB DOE Full 3⁽²⁻⁰⁾.

| Variáveis Independentes | Nível | | |
|-------------------------|-------|-------|------|
| | Baixa | Média | Alta |
| Volume de esferas (ml) | 50 | 75 | 110 |
| [N-amoniaco] de entrada | 50 | 79,6 | 90,6 |

Tabela 7 - Matriz de dados experimentais para o BB DOE Full 3⁽²⁻⁰⁾.

| Condição de teste | Replicata | Vol. (ml) de esferas | Entrada N-amoniaco (mg.L ⁻¹) | Saída N-NH ₄ ⁺ (mg. L ⁻¹) |
|-------------------|-----------|----------------------|--|---|
| 1 | 1 | 75 | 96,6 | 48 |
| 2 | 1 | 110 | 79,5 | 44 |
| 3 | 1 | 50 | 50,5 | 24 |
| 4 | 1 | 50 | 79,5 | 54 |
| 5 | 1 | 110 | 96,6 | 49 |
| 6 | 1 | 75 | 50,5 | 37 |
| 7 | 1 | 110 | 50,5 | 33 |
| 8 | 1 | 50 | 96,6 | 64 |
| 9 | 1 | 75 | 79,5 | 50 |
| 1 | 2 | 75 | 96,6 | 45 |
| 2 | 2 | 110 | 79,5 | 42 |
| 3 | 2 | 50 | 50,5 | 26 |
| 4 | 2 | 50 | 79,5 | 59 |
| 5 | 2 | 110 | 96,6 | 40 |
| 6 | 2 | 75 | 50,5 | 35 |
| 7 | 2 | 110 | 50,5 | 30 |
| 8 | 2 | 50 | 96,6 | 60 |
| 9 | 2 | 75 | 79,5 | 49 |

Fonte: Autora (2020)

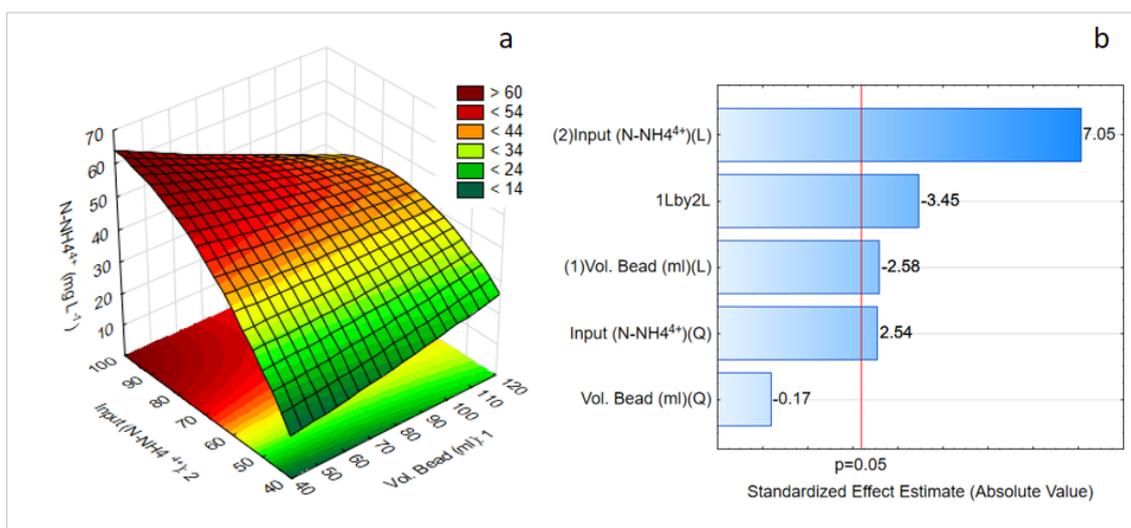
O resultado da análise de variância deste conjunto de dados é apresentado na Tabela 8, o gráfico de superfície de resposta e o diagrama de Pareto são mostrados na Figura 9.

Tabela 8- Dados ANOVA para o BB DOE Full 3⁽²⁻⁰⁾.

| | SS | df | MS | F | p |
|----------------------------|----------|----|----------|----------|----------|
| (1) Vol. Esfera (ml)(L) | 152,848 | 1 | 152,848 | 6,68354 | 0,023866 |
| Vol. Esfera (ml)(Q) | 0,735 | 1 | 0,735 | 0,03213 | 0,860741 |
| (2) Input (N-amoniaco) (L) | 1138,82 | 1 | 1138,820 | 49,79677 | 0,000013 |
| Input (N-amoniaco) (Q) | 147,865 | 1 | 147,865 | 6,46565 | 0,025807 |
| 1L by 2L | 273,401 | 1 | 273,401 | 11,95491 | 0,004738 |
| Error | 274,432 | 12 | 22,869 | | |
| Total SS | 2274,500 | 17 | | | |

* R-sqr=,87934; Adj:82907

Em relação ao BB DOE Full 3⁽²⁻⁰⁾ e para um nível de confiança de 95%, os dados da ANOVA e do diagrama de Pareto indicaram que tanto o volume de esferas quanto a concentração de afluente de N- amoniaco exerceram efeito significativo do ponto de vista estatístico sobre fator dependente monitorado ou respostas, (remoção de N-amoniaco). A variável independente (N-amoniaco de entrada) exerceu efeito sobre a variável dependente tanto em termos quadráticos quanto lineares, sendo a influência do tipo linear mais significativa que a do tipo quadrática, conforme pode ser observado na superfície de resposta, que apresenta um perfil parabólico suave em relação ao eixo entrada de N-amoniaco. Na Figura 9 está apresentada a superfície de resposta e o diagrama de Pareto para análise da influência da concentração afluente e volume de recheio na remoção de N-amoniaco.

Figura 9 - Superfície de resposta e diagrama de Pareto para o para o BB DOE Full 3⁽²⁻⁰⁾.

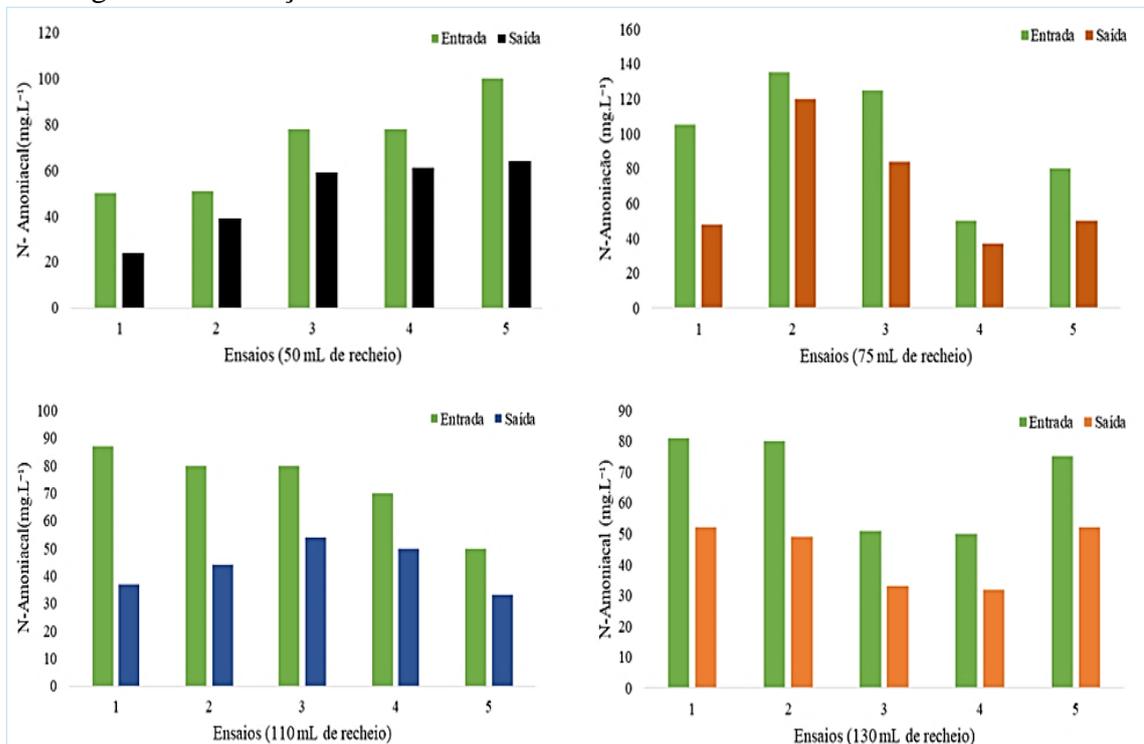
No que diz respeito ao volume de esferas, o efeito do tipo linear foi mais significativo que o quadrático, o que também explica o perfil parabólico suave ao longo do eixo (Vol. Bead). A interação entre os efeitos lineares das variáveis independentes também foi significativo, indicando que o volume de esferas exerce um efeito diferente para variados níveis de N-amoniacoal de entrada. O sinal negativo do efeito no volume de esferas indica que ao passo que o este parâmetro aumenta, o nível de N-amoniacoal na saída do sistema diminui. Em linhas gerais pode-se concluir que em níveis de entrada de N-amoniacoal até 50 mg L⁻¹, 40 ml de esfera são adequados para uma remoção de mais de 68% de NH₄⁺. Contudo, para concentrações NH₄⁺ acima de 50 mg. L⁻¹, o volume de esferas deve ser elevado gradativamente para remoções eficientes. A relação entre a concentração final de NH₄⁺ e os parâmetros volume de esferas e NH₄⁺ inicial pode ser expresso pelo modelo matemático apresentado na equação 1.

$$NH_4^+ \text{ final} = 87,46 + 0,413 * [\text{Vol. Esfera}] + 0,0004 * [\text{Vol. Esfera}]^2 + 2,91 * [NH_4^{4+} \text{ inicial}] - 0,01 * [NH_4^{4+} \text{ inicial}]^2 - 0,008 * [NH_4^{4+} \text{ inicial}] * [\text{Vol. Esfera}].$$

Equação I

Na Figura 10 está apresentado o comportamento da remoção de N-amoniacoal por *Chlorella* sp. imobilizada nos diferentes volumes de recheio testados.

Figura 10. Remoção de N-amoniacoal em diferentes volumes de esferas.



Lau et al (1997) defendem que a imobilização é um ambiente que pode permitir que as células em confinamento, suportem e assimilem maior concentração de nutrientes em tempos menores, sendo esta uma resposta celular ao aprisionamento em um pequeno espaço.

Comparando a eficiência entre os volumes de recheio de 50 e 130 mL em substratos com concentrações afluentes médias de N-amoniacoal de 76 e 67,4 mg.L⁻¹, foram registradas remoções médias respectivas de 30 e 36% respectivamente, sugerindo que o TDH parece ser mais significativo do que o volume de esferas na remoção de N- amoniacoal por *Chlorella* sp. de lixiviado de aterro sanitário.

Em todos os ensaios dos 5 tratamentos testados houve incremento de pH, com variações entre 0,3 e 1,1 unidades. Este resultado pode estar relacionado com o processo fotossintetizante das microalgas que, ao assimilar CO₂ para síntese de carboidratos eleva o pH do meio. Nesse sentido, o melhor desempenho de remoção média após 5 ensaios e 10h de TDH foi apresentada pelo volume de 110 mL de esferas com algas imobilizadas, sendo em torno de 39.6 %, equivalendo a 74,45 mg-N

5.4. CONCLUSÃO

Diante da análise dos dados obtidos pode-se concluir que:

- A *Chlorella* sp. imobilizada em alginato de cálcio manteve sua atividade fotossintética preservada, realizando remoções de 42 e 63% respectivamente para N-amoniacal e P-Total em TDH de 2h. Foram registradas ainda, remoções de alguns oligoelementos do lixiviado, a exemplo de: Mg^{2+} , K^+ , Ca^{2+} , SO_4^- , Si e Hg;
- Nos ensaios com suplementação de fosfato no substrato com relação empírica N:P de 14:1, as remoções médias de N-amoniacal foram em torno 57%, não apresentando variações importantes em relação ao substrato sem adição de fosfato, desta forma, não sendo necessária a adição de fosfato visando ampliar a eficiência do sistema;
- Os resultados de remoção de N-amoniacal em diferentes volumes de recheio indicaram que em concentrações afluentes na faixa de 48 e 103 $mg.L^{-1}$, as maiores remoções foram sempre no primeiro ensaio realizado com percentuais entre 37 e 57%. Enfatizando que em níveis de concentração afluentes de até 50 $mg.L^{-1}$ de N-amoniacal, o volume de 40 ml de esferas é eficiente para uma remoção de aproximadamente 68%;
- O alginato de cálcio apresentou-se como um polímero eficiente na imobilização e preservação da microalga, possibilitando o transporte de massa entre o efluente e a célula, bem como a passagem da luz para o processo da fotossíntese, interferindo minimamente na fisiologia da *Chlorella* sp.;
- A *Chlorella* sp. imobilizada em alginato de cálcio apresentou eficiência de remoção de N e P de LAS, despontando como uma biotecnologia viável e ambientalmente sustentável. A Fitorremediação foi alcançada através de uma combinação de mecanismos incluindo bioassimilação, precipitação como consequência do pH e adsorção na matriz polimérica. Desta forma, as microalgas imobilizadas indicam ser uma solução alternativa eficaz para a remoção de nutrientes de águas residuárias;
- O lixiviado de aterro sanitário é uma água residuária de extrema complexidade química e elevado potencial poluidor ao meio ambiente, destarte, em sua matriz existem constituintes importantes ao crescimento de microalgas, possibilitando neste panorama, a inserção da fitorremediação como forma complementar aos tratamentos já existentes.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION -APHA, AWWA, WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22th ed. **Washington, D.C**, 2012.
- ARAÚJO, N. C.; SOUSA, J.; LEITE, V. D.; SILVA, M. C. C. P. Potencial de remoção de fósforo em biorreator operado com células de *Chlorella* sp. imobilizada em matriz de alginato de cálcio, **Science & Engineering Journal**, v.26, p. 59-65, 2018.
- 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, p.1- 5,1963.
- BOROWITZKA, M. A. Micro-algal Biotechnology Cambridge. **University Press. Cambridge**. 1988.
- BUCHAUER, K. A comparison of two simple titration procedures to determine volatile fatty acids in influents to wastewater and sludge treatment process. **Water SA**, v.24, n^o 1, p. 49-56, 1998.
- CUELLAR-BERMUDEZ. S.P.; ALEMAN-NAVA. G.S.; CHANDRA. R, GARCIA-PEREZ. J.S.; CONTRERAS-ANGULO. J.R.; MARKOU. G.; MUYLEAERT. K.; RITTMANN. B.E.; PARRA-SALDIVAR. R. Nutrients utilization and contaminants removal. A review of two approaches of algal and cyanobacteria in wastewater. **Algal Research**, v. 24, p.438-449, 2017.
- DE-BASHAN, L. E & BASHAN, Y. Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. **Bioresource Technology**, v. 101, p.1611–1627, 2010.
- DE CASTRO J.S.; CALIJURI M.L.; ASSEMANY, P, P.; CECON, P, R.; DE ASSIS, I, R.; RIBEIRO V, J. Microalgae biofilm in soil: greenhouse gas emissions, ammonia volatilization and plant growth. **Sci Total Environ.** ,v. 574, p.1640–1648, 2017.
- DE GODOS, I.; BLANCO, S.; GARCIA-ENCINA, P.A.; BECARES, E.; MUÑOZ, R. Long-term operation of high rate algal ponds for the bioremediation of piggery wastewaters at high loading rates. **Bioresource Technology.** ,v. 100, p. 4332-4339, 2009.
- FILIPPINO, K, C.; MULHOLLAND, M, R.; BOTT, C, B; Phycoremediation strategies for rapid tertiary nutrient removal in waste stream. **Algal Research**, v. 11, p.125-133, 2015.
- GORHAM, P.R.; MCLACHLAN, J.; HAMMER, U.T.; KIM, W.K. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (lyng) de Breb. **Verh. Int. Verein. Limnol.** v. 15, p.796-804, 1964.
- JEBALI, A.; ACIÉN, F.G.; SAYADI, S.; MOLINA-GRIMA, E. Utilization of centrate from urban wastewater plants for the production of *Scenedesmus* sp. in a raceway-simulating reactor. **Journal of Environmental Management**, v. 211, p.112-124, 2018.
- JIA H.; YUAN Q. Removal of nitrogen from wastewater using microalgae and microalgae-bacteria consortia. **Cogent Environ Sci**; v. 2, p.1–15, 2016.

JIMENEZ-PEREZ, M. V.; SANCHEZ-CASTILLO, P.; ROMERA, O.; FERNANDEZ-MORENO, D.; PEREZ-MARTINEZ, C.; Growth and removal of nutrients in free and immobilized planktonic green algae isolated from pig manure. **Enzima Microb. Technol.**, v. 34, p.392–398, 2004.

KAPARAPU, J. Micro algal immobilization techniques. **Journal of Biomass Utilization**, v. 8, p. 64-70, 2017.

KIRK, M.M.; K.L. KIRK. Carrier-mediated uptake of originine and urea by *Volvox carteri* f. nagariensis. **Plant Physiol.**, v.61, p.451-45., 1978a.

NAVEEN, B.P.; MAHAPATRA, D.M.; SITHARAM, T.G.; SIVAPULLAIAH, P.V.; RAMACHANDRA, T.V. Physico-chemical and biological characterization of urban municipal landfill leachate, **Environ. Pollut.** , v. 220, p. 1–12, 2016.

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, p. 945-951, 1997.

LEITE, V.D.; PEARSON, W. H.; SOUSA, J.T.; LOPES, W.S. The removal of ammonia from sanitary landfill leachate using a series of shallow waste stabilization ponds. **Water Science & Technology**, v. 63, p.666 -670, 2011.

LEITE, V.D.; OLIVEIRA, A.G.; CAMPOS, A.R.C.; SOUSA, J.T.; LOPES, W.S.; OLIVEIRA, E.G. Tratamento conjugado de lixiviado de aterros sanitário e esgoto doméstico em lagoas de estabilização. **Revista DAE**, p.77-93, 2017.

MISHA, A.; MEDHI, K.; MAHESHWARI, N.; SRIVASTAVA, S.; TRAKUR, I, S. Biofuel production and phycoremediation by *Chlorella* sp. ISTLA1 isolated from landfill site. **Bioresource Technology**, v. 253, p. 121-129, 2018.

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

MUJTABA, G.; RIZWAN, M.; LEE, K. Simultaneous removal of inorganic nutrients and organic carbon by symbiotic co-culture of *Chlorella vulgaris* and *Pseudomonas putida*. **Biotechnology Bioprocess Eng.**, v. 20, p. 1114-1122, 2017.

OLIVEIRA, A.G; Indicadores microbiológicos do tratamento conjugado de lixiviado de aterro sanitário e esgoto sanitário em lagoas de estabilização rasas. Dissertação de Mestrado-PPGCTA- **Universidade Estadual da Paraíba**, 2013, Campina Grande- PB.

PASKUALIAKOVA. A.; TONRY.S. TOUZET.N, Microalgae isolation and selection for the treatment of landfill leachate. **WIT Transactions on Ecology on the Environment**, v. 209, p. 1743- 3541, 2016.

PASKULIAKOVA, A; MCGOWAN, T; TONRY, S; TOUZET, N. Phycoremediation of landfill leachate with the chlorophyte *Chlamydomonas* sp. SW15aRL and evaluation of toxicity pre and post treatment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.147, p. 622-630, 2018.

- 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**. v. 2, p. 355-372. 2001.
- RICHARDS R.G.; MULLINS B.J. Using microalgae for combined lipid production and heavy metal removal from leachate. **Ecology Model.**, v. 249, p. 59–67, 2013.
- SAUER, N. A general amino acid permease is inducible in *Chlorella vulgaris*. **Planta**. , v. 161, p. 425-431, 1984.
- SILVA, M.C.C.P.; LEITE, V.D.; SOUSA, J.T.; PEARSON, H.W. Remoção de nutrientes de efluente secundário oriundo de filtro de areia usando a microalga *Chlorella sp.* imobilizada em matriz de alginato de cálcio. 9º Encontro Internacional das Águas, **Universidade Católica de Pernambuco**, 2017.
- SILVA, M, C, C, P.; LEITE, V, D.; ALBUQUERQUE, M, V, C.; SILVA JUNIOR, J, F. Tratamento de lixiviado de aterro sanitário aplicando microalgas em meio não suplementado de nutrientes. **Terra – Habitats Urbanos e Rurais**. p.1398-1409. 2018.
- SILVA, M.C.C.P.; PEARSON, H.W.; SILVA DO Ó, K.D.; SOUSA, J.T.; CANTO, C.S.A.; LEITE, V.D. Remoção de nitrogênio amoniacal de lixiviado de aterro sanitário aplicando *Chlorella sp.* Imobilizada em matriz de alginato de cálcio em reatores tubulares. **X Simpósio Brasileiro de Engenharia Ambiental e Sanitária**. Recife- PE, 2019.
- SILVA, M.C.C.P.; CARTAXO, A.S.B.; SOUSA, A.R.; PEARSON, H.W.; LEITE, V.D. Remoção de nitrogênio amoniacal de lixiviado de aterro sanitário aplicando *Chlorella sp.* em biorreator alimentado em fluxo contínuo. I Congresso Internacional de Meio Ambiente e Sociedade. In: ANAIS- 442. **Editora Realize**, 2019.
- SONAWANE, J.M.; ADELOJU, S.B.; GHOSH, P.C. . Landfill leachate: A promising substrate for microbial fuel cells. **Int. J. Hydrogen Energ.**, v. 42, p. 23794-23798, 2017.
- TETT, P.; DROOP, M.R.; HEANEY, S.I. “The redfield ratio and phytoplankton growth rate,” **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 65, p. 487–504, 1985.
- UTERMÖHL, H. Zur Vervollkommung der quantitativen phytoplankton methodik. **Mitteilungen Internationale Vereinigung fur Theoretische und Angewandte Limnologie**, v.9, p. 1-38, 1958.
- ZAGATTO, P.A. e ARAGÃO, M.A. 1992. Implantação de métodos para avaliação de algas tóxicas. São Paulo, **Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB)**, Relatório Técnico, 23p.
- ZAMANI, N.; NOSHADI, M.; AMIN, S.; NIAZI, A.; GHASEMI, Y. Effect of alginate wastewater. **Journal Appl. Phycol.** , v. 24, p. 649-656, 2012.
- ZHAO, X.; ZHOU, Y.; HUANG, S.; QIU, D.; SCHIDEMAN, L.; CHAI, X.; ZHAO, Y. Characterization of microalgae-bacteria consortium cultured in landfill leachate for carbon fixation and lipid production. **Bioresource Technology**, v. 156, p. 322–328, 2014.

CONCLUSÃO GERAL

A partir dos resultados apontados por esta pesquisa, pode-se concluir que:

- A compreensão da fisiologia e adaptação de algumas espécies de microalgas e sua aplicação na biorremediação de águas residuárias é uma janela aberta de muitas possibilidades, para tanto, a identificação molecular da célula é etapa indispensável. O protocolo estabelecido no presente trabalho, foi capaz de extrair DNA genômico de *Chlorella* sp. com qualidade e pureza satisfatórias, podendo este, ser aplicado na identificação molecular de Chlorophyceas;
- O lixiviado de aterro sanitário é uma água residuária de considerável complexidade química e elevado potencial poluidor ao meio ambiente, destarte, em sua matriz existem constituintes importantes ao crescimento de microalgas, possibilitando neste panorama, a inserção da fitorremediação como forma complementar aos tratamentos já existentes;
- O processo de imobilização de microalgas em matriz de alginato de cálcio é uma tecnologia que preserva a célula de componentes tóxicos do lixiviado e promove remoção eficaz de nutrientes de águas residuárias em tempo de contato significativamente menor em comparação aos sistemas de microalgas suspensas, superando ainda, diversas dificuldades operacionais inerentes aos sistemas de lagoas de estabilização, a exemplo da liberação de células junto ao efluente tratado, a demanda de grandes áreas para instalação do sistema e trabalho com microbiota diversificada;
- A cepa de *Chlorella* sp. isolada do lixiviado do ASMJP apresentou robustez fisiológica, uma vez que, foi viável o seu crescimento em faixas muito amplas de N-amoniaco que variaram entre 50 e 2175 mg.L⁻¹, ratificando sobremaneira, o grande potencial das microalgas na recuperação de recursos (N e P) de águas, podendo esta ser aplicada na mitigação da problemática da eutrofização dos mananciais;
- A análise matricial dos dados obtidos ao longo das etapas do presente trabalho ratificam a viabilidade econômica e ambiental da aplicação das microalgas do gênero *Chlorella* sp. em sistemas livres e imobilizados no tratamento de lixiviado de aterro sanitário.

RECOMENDAÇÕES

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

- Analisar estudos comparativos de eficiência de remoção de nutrientes (N e P) de lixiviado entre sistemas livres e imobilizados mantendo igual densidade celular e mesmo TDH;
- Investigar novas configurações geométricas para os biorreatores, favorecendo aos processos metabólicos (notadamente a fotossíntese) que é fundamental nos sistemas de algas imobilizadas;
- Analisar um balanço de massa do N-amoniaco e do P-total que entra e sai no sistema, visando estabelecer ligação mais definida entre a remoção de nutrientes e o crescimento da *Chlorella* sp. no interior da esfera;
- Desenvolvimento de novas pesquisas que visem a melhoria na qualidade dos polímeros de forma a aumentar sua resistência aos componentes estruturantes do lixiviado de aterro sanitário, bem como, a difusão das substâncias e passagem da luminosidade até a célula;
- Analisar testes de toxicidade crônica seguindo recomendações da NBR 12.648/2018, para verificar o efeito inibitório ou tóxico do lixiviado para a cepa da *Chlorella* sp. em sistemas suspensos e imobilizados;
- Realizar o sequenciamento genético do DNA genômico da microalga em estudo para identificação da espécie que está sendo investigada na pesquisa.

APÊNDICES

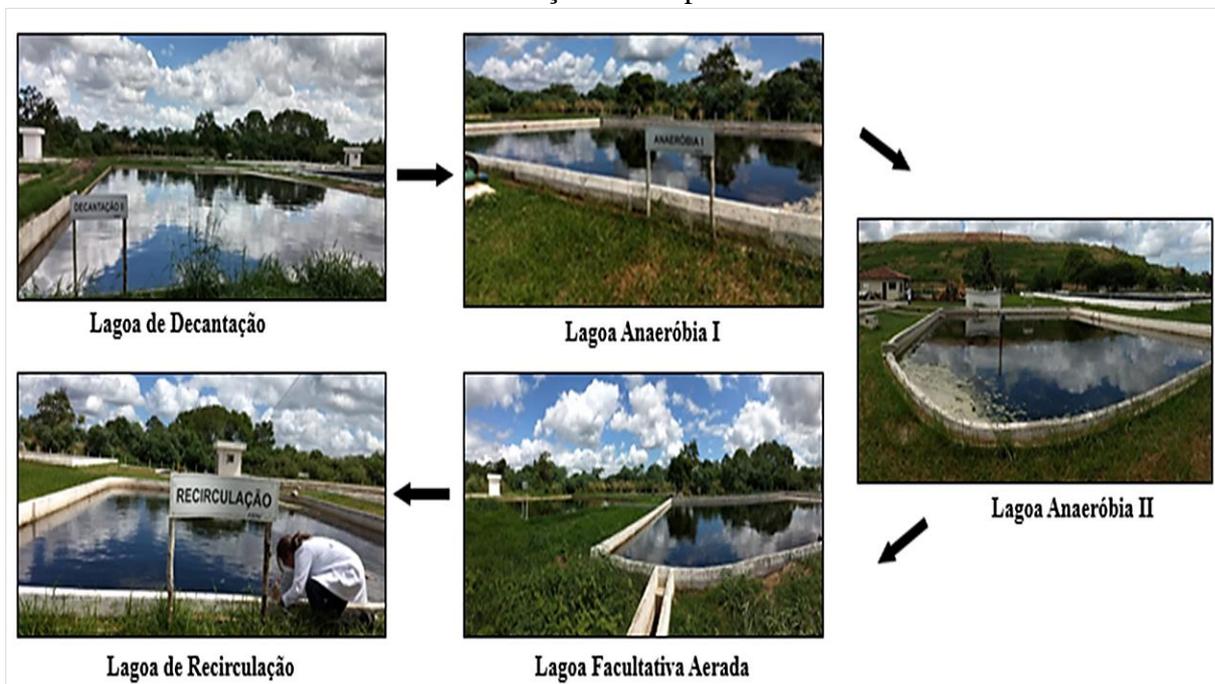
APÊNDICE A- Sistema de lagoas de tratamento de lixiviado do ASMJP-PB.

Figura A-1-. Vista aérea do aterro sanitário metropolitano de João Pessoa com destaque para as lagoas de tratamento de lixiviado.



Fonte: Google Earth

Figura A-2. Coleta de amostras em pontos de entrada e saída do sistema de lagoas para identificação do fitoplâncton



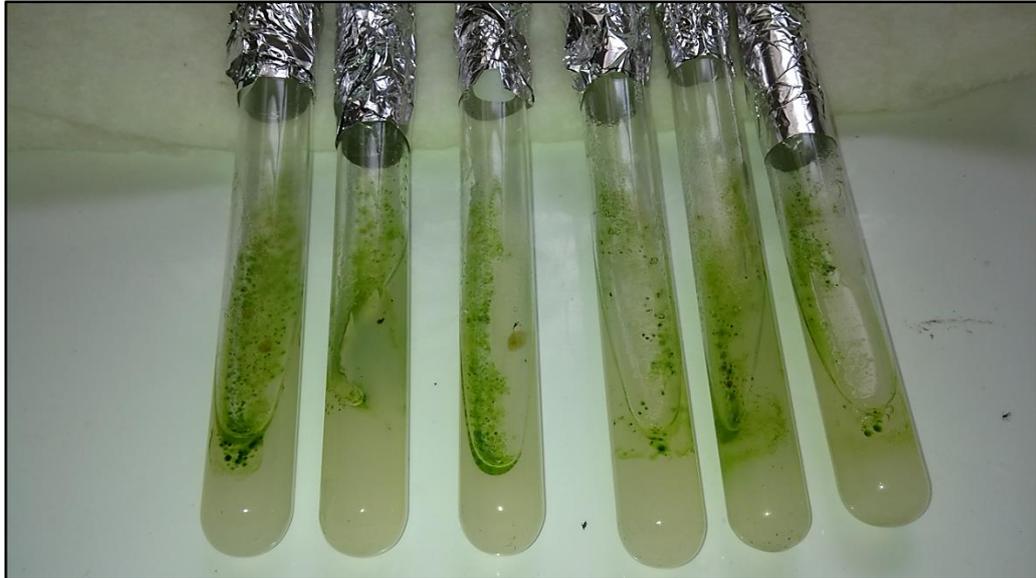
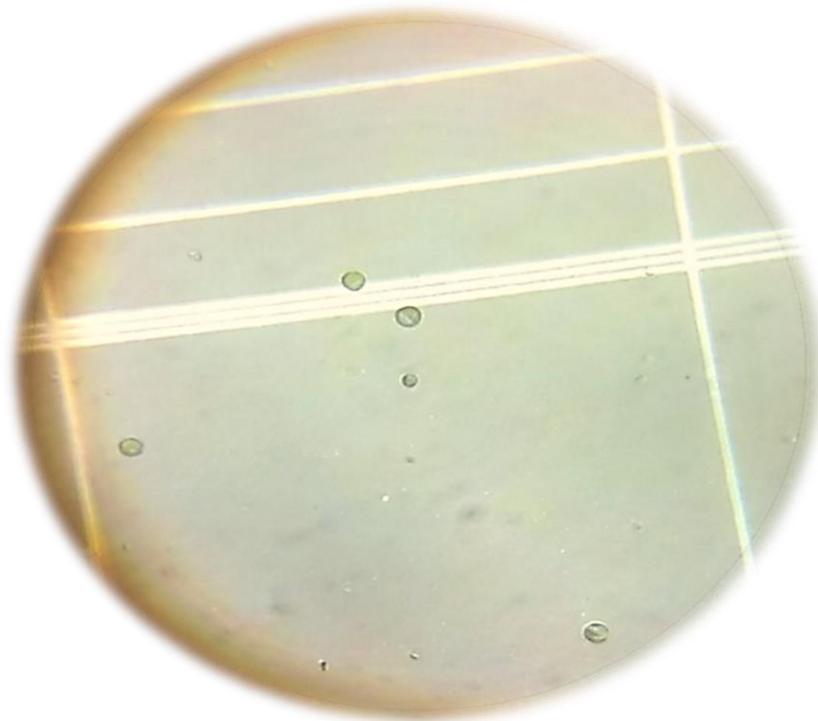
APÊNDICE B- Comunidade fitoplânctônica isolada do lixiviado.

Figura B-1. Cultura de fitoplâncton isolado do sistema de lagoas de lixiviado em meio ASM-1



Quadro B-2. Composição taxonômica do sistema de lagoas de tratamento de lixiviado do ASMJP-PB.

| LAGOAS DE TRATAMENTO DE LIXIVIADO | TÁXONS IDENTIFICADOS |
|-----------------------------------|--|
| LAGOA DE DECANTAÇÃO | <i>Chlorella</i> sp., <i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>Pseudoanabaena</i> sp, <i>Kamptonema animale</i> , <i>Geitlerinema amphibium</i> , <i>Cyclotella menenghiniana</i> , <i>Navicula</i> sp., <i>Merismopedia</i> sp., <i>Nitzschia</i> sp. |
| LAGOA ANAERÓBIA I | <i>Chlorella</i> sp., <i>Lyngbyia</i> sp., <i>Oscilatória</i> sp, <i>Dolichospermus nygaardi</i> , <i>Phormydium</i> , sp. <i>Cylindrospermopsis raciboorki</i> , <i>Microcystis aeruginosa</i> . |
| LAGOA ANAERÓBIA II | <i>Chlorella</i> sp., <i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>Pseudoanabaena</i> sp, <i>Trachelomonas volvocinopsis</i> , <i>Phacus</i> sp., <i>Cylindrospermopsis raciboorki</i> . |
| LAGOA FACULTATIVA AERADA | <i>Chlorella</i> sp. <i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>Phacus</i> sp., <i>Cyclotella menenghiniana</i> . |
| LAGOA DE RECIRCULAÇÃO | <i>Chlorella</i> sp., <i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>Monoraphidium</i> sp. <i>Phacus</i> sp., <i>Cyclotella menenghiniana</i> . |

APÊNDICE C- *Chlorella* sp.Figura C-1. Cultura estoque de *Chlorella* sp. em MBB+Ágar1,5%Figura C-2. Contagem de *Chlorella* sp. em câmara Neubauer

APÊNDICE D- *Chlorella* sp. imobilizada em alginato de cálcio

Figura D-1. Sistema de imobilização da *Chlorella* sp.



Figura D-2. Amostras de esferas com algas imobilizadas e controle (Alginato a 4%)



APÊNDICE E- METODOLOGIA DE ETAPAS DA PESQUISA

Figura E-1. Fluxograma de etapas iniciais da pesquisa

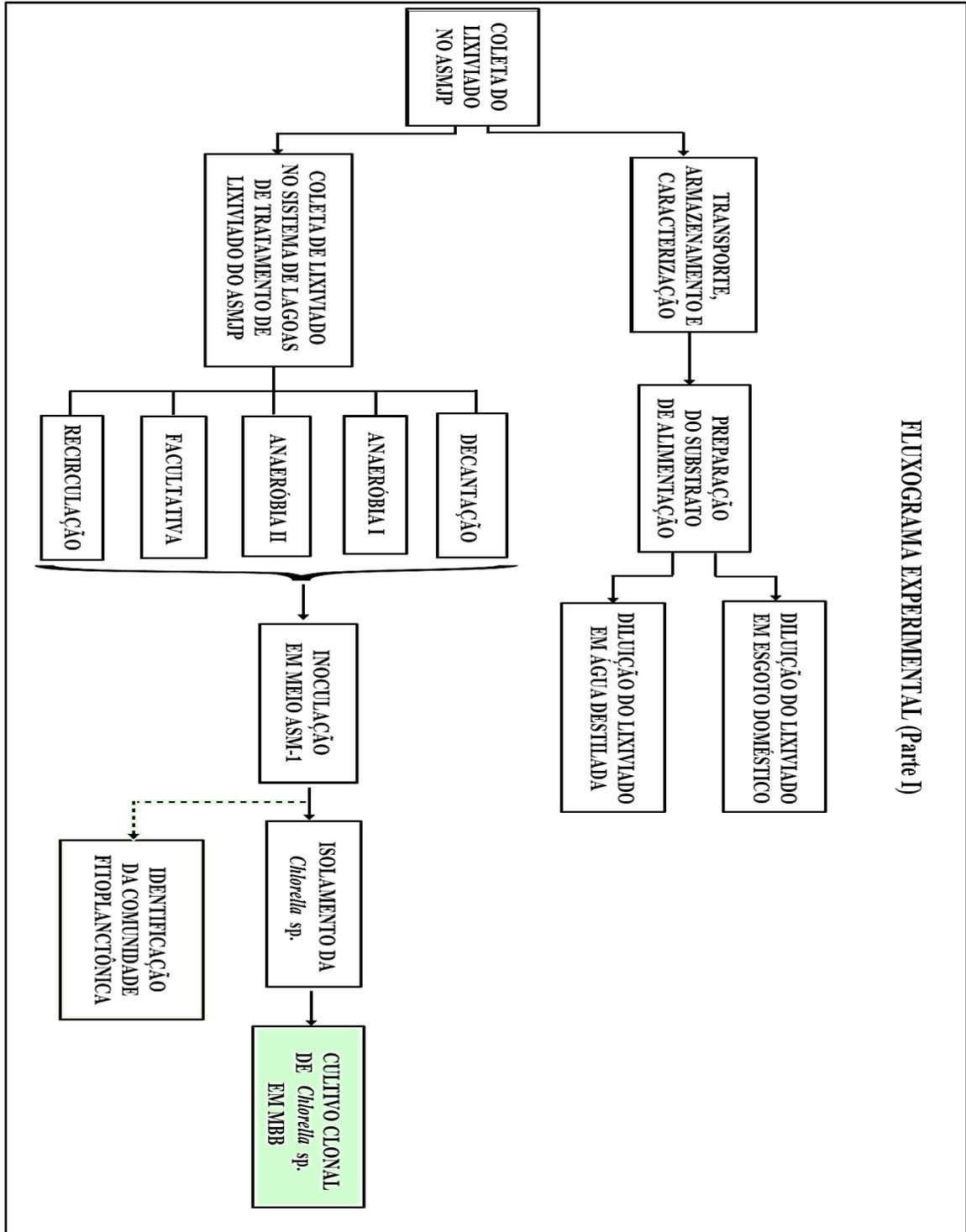
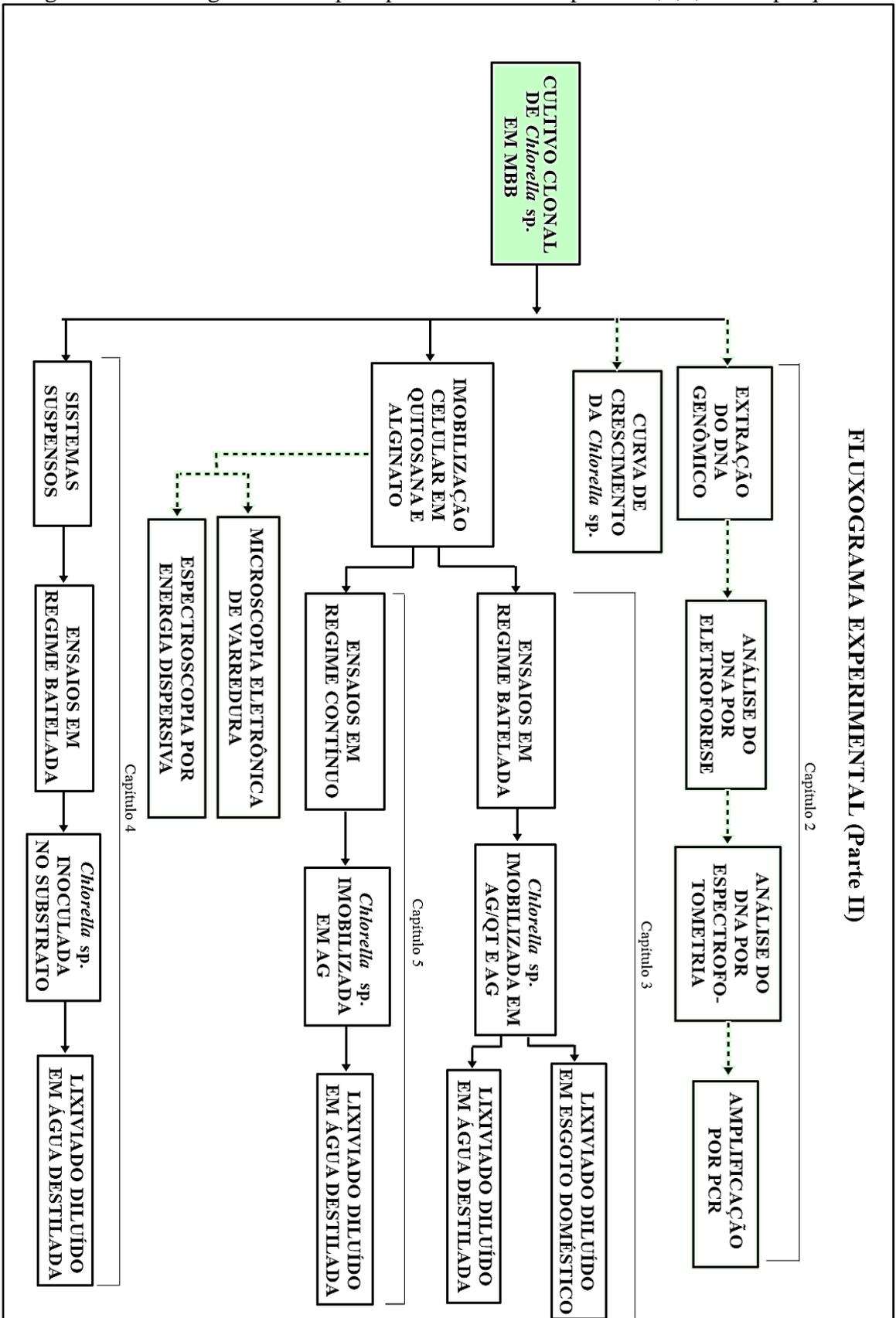
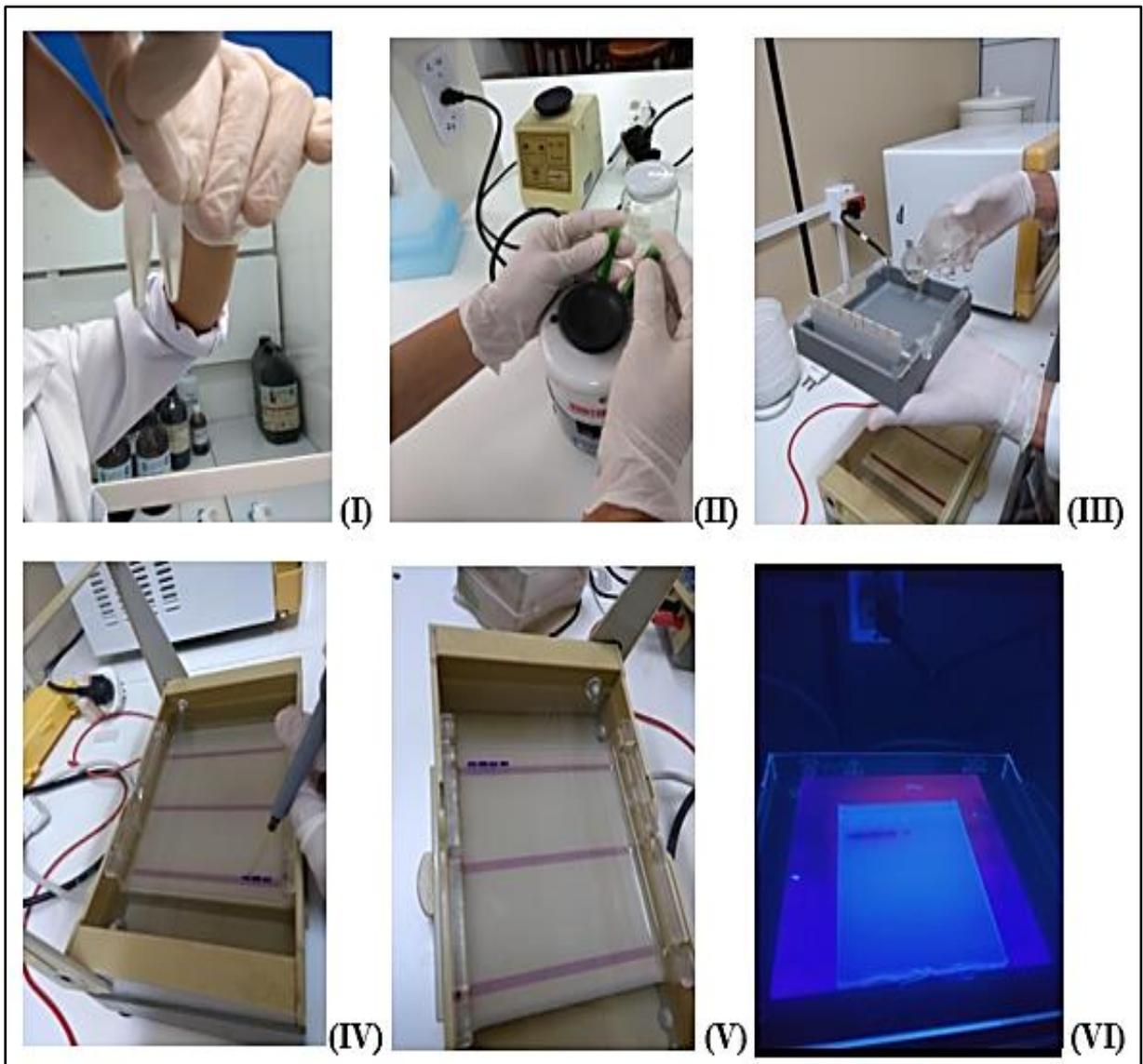


Figura E-2. Fluxograma de etapas apresentadas nos capítulos 2,3,4, e 5 da pesquisa.



APÊNDICE F- Etapas do protocolo de extração do DNA genômico da *Chlorella* sp. no LBiotec- UFCG- Cuité-PB.

Figura F-1. I- Isolamento do DNA; II- Homogeneização de amostra em vórtex; III- preparação de cuba de eletroforese por gel de agarose 1%; IV- Preenchimento de poços em gel de agarose; V- Início de corrida de DNA a 100 V; VI- Visualização de bandas de DNA em luz UV.



APÊNDICE G- Caracterização Físico-química do lixiviado do ASMJP aplicado na pesquisa.

Tabela G-1. Valores médios dos principais parâmetros monitorados do lixiviado aplicado na pesquisa.

| PARÂMETRO | Magnitude (n=6) |
|--|------------------------|
| Alcalinidade Total(mg.CaCO₃.L⁻¹) | 10141 |
| Ácidos Graxos Voláteis(H_{Ac}.L⁻¹) | 1324 |
| DQO total (mgO₂. L⁻¹) | 4929 |
| DQO filtrada (mgO₂. L⁻¹) | 3388 |
| DBO₅ (mgO₂. L⁻¹) | 1163,2 |
| NTK (mgN. L⁻¹) | 3048 |
| N-NH₄⁺(mg- NH₄⁺.L⁻¹) | 2483 |
| N-NO₃⁻ (mg N- NO₃⁻. L⁻¹) | 7,38 |
| NO₂⁻ (mgNO₂⁻. L⁻¹) | - |
| ST (mg. L⁻¹) | 12685 |
| STV (mg. L⁻¹) | 3792 |
| STF (mg. L⁻¹) | 8894 |
| Ortofosfato (mg Orto-P. L⁻¹) | 14,184 |
| Fósforo Total (mg. L⁻¹) | 21 |
| Cl⁻ (mg. L⁻¹) | 4076 |
| Na⁺ (mg. L⁻¹) | 2180 |
| K⁺ (mg. L⁻¹) | 1982 |
| Mg⁺⁺(mg. L⁻¹) | 199 |
| Ca⁺⁺(mg. L⁻¹) | 242 |
| pH | 8,0 |