

**Tratamento de lixiviado de aterro sanitário aplicando *Chlorella* sp. imobilizada em diferentes matrizes poliméricas**

**Treatment of leached from landfill applying *Chlorella* sp. immobilized in different polymeric matrices**

**Tratamiento de fugas de relleno aplicando *Chlorella* sp. inmovilizados en diferentes matrices poliméricas**

Recebido: 03/12/2020 | Revisado: 08/12/2020 | Aceito: 10/12/2020 | Publicado: 13/12/2020

**Maria Célia Cavalcante de Paula e Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6391-0261>

Universidade Estadual da Paraíba, Brasil

E-mail: [celiadoutorado@gmail.com](mailto:celiadoutorado@gmail.com)

**Valderi Duarte Leite**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5861-7407>

Universidade Estadual da Paraíba, Brasil

E-mail: [mangabeiraleite@gmail.com](mailto:mangabeiraleite@gmail.com)

**Maria Virgínia da Conceição Albuquerque**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5060-584X>

Universidade Estadual da Paraíba, Brasil

E-mail: [virginia.albuquerque@yahoo.com.br](mailto:virginia.albuquerque@yahoo.com.br)

**Amanda da Silva Barbosa Cartaxo**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2514-6941>

Universidade Estadual da Paraíba, Brasil

E-mail: [mailsoncartaxo@gmail.com](mailto:mailsoncartaxo@gmail.com)

**Railson de Oliveira Ramos**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8525-9529>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: [railsondemais@hotmail.com](mailto:railsondemais@hotmail.com)

**Wilton Silva Lopes**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0151-7664>

Universidade Estadual da Paraíba, Brasil

E-mail: [wiltonuepb@gmail.com](mailto:wiltonuepb@gmail.com)

## Resumo

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 de alginato/quitosana (AG/QT) e alginato de cálcio (AG). Dois sistemas de tratamento foram avaliados, um com biorreatores tubulares alimentados com substrato constituído por lixiviado de aterro sanitário (LAS) *in natura* mais esgoto doméstico (ED) e outro sistema constituído por biorreatores cônicos, tendo como substrato LAS diluído em água destilada. Os ensaios foram realizados em regime batelada a 27° C e luminosidade de 85  $\mu\text{E} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ . As análises de MEV e EDS da superfície das esferas indicaram que a estrutura suporte possui porosidade e retém as células em seu interior. Foram constatadas eficiências de remoções de nitrogênio amoniacal de 40% após 4h de tratamento do substrato LAS/ED com microalga imobilizada em AG/QT. Já nos ensaios da *Chlorella* sp. imobilizada em AG, foram registradas eficiências remoções entre 81 e 97% após 2h de tratamento do substrato LAS diluído em água destilada. Além disso, 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. Tais resultados indicam vantagens significativas do uso de microalgas imobilizadas para o tratamento de águas residuárias, tanto em termos recuperação e reciclagem de recursos, quanto em relação ao potencial fitorremediativo da *Chlorella* sp. na remoção de nitrogênio amoniacal de lixiviado de aterro sanitário.

**Palavras-chave:** Lixiviado; Fitorremediação; Microalgas imobilizadas; Nitrogênio amoniacal; Alginato de cálcio; Quitosana.

## Abstract

In this work, the capacity to remove ammonia nitrogen from landfill leachate previously diluted by *Chlorella* sp. immobilized in polymeric matrices of alginate/chitosan (AG/QT) and calcium alginate (AG). Two treatment systems were evaluated, one with tubular bioreactors fed with a substrate consisting of landfill leachate (LAS) *in natura* plus domestic sewage (ED) and another system consisting of conical bioreactors, having LAS substrate diluted in distilled water. The tests were carried out in batch mode at 27° C and luminance of 85  $\mu\text{E} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ . The MEV and EDS analyzes of the surface of the spheres indicated that the support structure has porosity and retains the cells inside. Efficiencies of 40% ammonia nitrogen removal were observed after 4 hours of treatment of the LAS/ED substrate with microalgae immobilized in AG/QT. In the trials of *Chlorella* sp. immobilized in AG, removal efficiencies between 81 and 97% were recorded after 2 hours of treatment of the LAS substrate diluted in distilled

water. In addition, *Chlorella* sp. presented efficiency of removal of 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. These results indicate significant advantages of using immobilized microalgae for the treatment of wastewater, both in terms of resource recovery and recycling, and in relation to the potential phytoremediation of *Chlorella* sp. in the removal of ammoniacal nitrogen from landfill leachate.

**Keywords:** Leachate; Phytoremediation; Immobilized microalgae; Ammoniacal nitrogen; Calcium alginate; Chitosan.

### Resumen

En este trabajo, la capacidad de remover nitrógeno amoniacal del lixiviado de relleno sanitario previamente diluido por *Chlorella* sp. Inmovilizado en matrices poliméricas de alginato / quitosano (AG / QT) y alginato de calcio (AG). Se evaluaron dos sistemas de tratamiento, uno con biorreactores tubulares alimentados con un sustrato compuesto por lixivios de vertedero (LAS) in natura más alcantarillado doméstico (ED) y otro sistema compuesto por biorreactores cónicos, con sustrato LAS diluido en agua destilada. Las pruebas se realizaron en modo discontinuo a 27°C y luminancia de 85  $\mu\text{E}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ . Los análisis SEM y EDS de la superficie de las esferas indicaron que la estructura de soporte tiene porosidad y retiene las células en su interior. Se observaron eficiencias de eliminación de nitrógeno amoniacal al 40% después de 4 horas de tratamiento del sustrato LAS/ED con microalgas inmovilizadas en AG/QT. En los ensayos de *Chlorella* sp. Inmovilizados en AG, se registraron eficiencias de eliminación entre 81 y 97% después de 2 horas de tratamiento del sustrato LAS diluido en agua destilada. Además, *Chlorella* sp. presentaron eficiencia de remoción de N-amoníaco de LAS diluidas en agua destilada en el rango de 49 a 98% con incrementos de oxígeno disuelto de hasta 192% en 5 h de monitoreo. Estos resultados indican ventajas significativas del uso de microalgas inmovilizadas para el tratamiento de aguas residuales, tanto en términos de recuperación y reciclaje de recursos, como en relación con la potencial fitorremediación de *Chlorella* sp. en la remoción de nitrógeno amoniacal del lixiviado de vertederos.

**Palabras clave:** Lixiviados; Fitorremediación; Microalgas inmovilizadas; Nitrógeno amoniacal; Alginato de calcio; Quitosano.

## 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 anaeróbico que recebe uma massa de resíduo sólidos urbanos, extremamente, complexa e heterogênea que propiciam 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<sub>5</sub>/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<sub>4</sub><sup>+</sup>) e determinadas situações de metais pesados, sempre estão presentes 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 e 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 o grupo das Chlorophyceas. 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).

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).

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).

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

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Considerações gerais

A investigação científica é a construção e a busca de um saber que acontece no momento em que se reconhece a ineficácia dos conhecimentos existentes, incapazes de responder de forma consistente e justificável às perguntas e dúvidas levantadas. É o reconhecimento das limitações existentes no saber já estabelecido e da necessidade de produzi-lo para esclarecer e proporcionar a compreensão de uma dúvida. Nesse sentido, iniciar uma investigação científica é reconhecer a crise de um conhecimento já existente e tentar modificá-lo, ampliá-lo ou substituí-lo, criando um novo que responda à pergunta existente (Koche, 2011).

Na concepção de Pereira et al. (2018) O conhecimento científico tem como principais características ser real, factual, contingente, sistemático, verificável e falível. Nessa perspectiva, a presente pesquisa é de natureza laboratorial e quantitativa, tendo sido delineada e desenvolvida considerando todos os aspectos supracitados.

A parte experimental 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.

## 2.2 Reagentes

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

CaCl<sub>2</sub> (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 NaNO<sub>3</sub> (250 mg L<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (75 mg L<sup>-1</sup>), NaCl (25 mg L<sup>-1</sup>), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (75 mg L<sup>-1</sup>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (175 mg L<sup>-1</sup>), CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O (25 mg.L<sup>-1</sup>), ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (8.82 mg L<sup>-1</sup>), MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O (1,44 mg L<sup>-1</sup>), MoO<sub>3</sub> (0.71 mg.L<sup>-1</sup>), CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O (1,57 mg L<sup>-1</sup>), Co (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O (0,49 mg L<sup>-1</sup>), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (11,42 mg. L<sup>-1</sup>), Na<sub>2</sub> EDTA (50 mg L<sup>-1</sup>), KOH (31 mg L<sup>-1</sup>), FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (4.98 mg L<sup>-1</sup>).

## 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. A observação do gênero algal foi procedida em microscópio invertido da marca Coleman 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.

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. As amostragens foram feitas a cada 48 h em câmara de Neubauer, usando-se microscópio óptico modelo OLEMAN. A determinação da densidade celular seguiu o que está preconizado por Tavares e Rocha (2003), aplicando-se a Equação 1.

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

Eq.1

## 2.4 Imobilização da *Chlorella* sp. em alginato (AG) e alginato/quitosana (AG/QT)

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:

- *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.

- *Preparação das esferas de alginato*: 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<sup>-1</sup>. A solução alga/alginato em proporção 1:1, foi gotejada em solução receptora de CaCl<sub>2</sub> 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 cm<sup>3</sup> e diâmetro de 4mm, mantidas imersas nesta solução por 60 minutos visando o aumento de sua resistência mecânica.

- *Preparação de algas imobilizadas 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. 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  $15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  através de um tubo de silicone com 80 cm e 4 mm de diâmetro. A solução alga/AG/QT foi gotejada na solução de  $\text{CaCl}_2$  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  $10 \mu\text{m}$ .

- *Preparação do substrato:* 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. O ED apresentou concentração média de nitrogênio amoniacal em torno de  $96 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  para  $2730 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  do LAS.

Para quantificação dos cátions ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+$ ) do lixiviado a amostra foi diluída na proporção 2:1 e filtrada em membrana de fibra de vidro de  $0,45 \mu\text{m}$  e em seguida  $0,22 \mu\text{m}$ . A amostra foi injetada no cromatógrafo iônico da DIONEX-THERMO. O ED e o LAS foram caracterizado quimicamente, conforme métodos preconizados por APHA, (2012).

- *Estudo do pH em diferentes matrizes imobilizantes:* objetivando avaliar a interferência da matriz imobilizante no processo fotossintetizante algáceo, 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.

## 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<sup>-1</sup>.

Aplicou-se um Planejamento Fatorial em dois níveis, 2<sup>3</sup>, 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 (85µE.s<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup>) 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 mL.min<sup>-1</sup>, 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.

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 6,86×10<sup>2</sup> esferas, com densidade

celular de  $5,49 \times 10^4$  células.mL<sup>-1</sup>, 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<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup>. 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).

Foi realizada 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<sup>-1</sup>. As análises foram realizadas através da técnica de elétrons primários usando aparelho TM-1000 da marca HITACHI equipado com 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 consequentemente 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 1.

**Tabela 1.** 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 <sup>-1</sup> )	5,0×10 <sup>4</sup>	5,0×10 <sup>4</sup>	5,04×10 <sup>4</sup>
TDH	4 e 5(h)	2 (h)	15 dias
Regime de alimentação	Batelada intermitente	Batelada intermitente	Batelada intermitente
Parâmetros avaliados	pH/N-amoniacoal	pH/OD/N-amoniacoal	pH/OD/Turbidez/N-amoniacoal

Fonte: Dados de pesquisa

Conforme pode ser observado na Tabela I, a geometria do biorreator, o tipo de substrato e o TDH foram reajustados em função da passagem da luz para melhor eficiência do processo fotossintético pela microalga.

## 2.6 Análise estatística

A realização dos ensaios com algas imobilizadas em esferas AG/QT, seguiu um planejamento experimental design full fatorial 2<sup>(2-0)</sup> (DOE 2<sup>(2-0)</sup>) 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<sup>-1</sup>) e a remoção N-amoniacoal (mg L<sup>-1</sup>). 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. Resultados e Discussão

### 3.1 Caracterização química do LAS e do ED

O pH do lixiviado *in natura*, durante o período de realização da pesquisa ficou em torno de 8,6 e isto significa dizer que da concentração total de nitrogênio amoniacoal, 94,7%

(percentagem em volume) se encontrava na forma ionizada, favorecendo então a maior concentração de amônia ionizada (em torno de 94,7% de  $\text{NH}_4^+$ ) em relação à amônia gasosa (aproximadamente 5,3% de  $\text{NH}_3$ ) 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 2.

**Tabela 2.** 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( $\text{HAcL}^{-1}$ )	472	200
DQO total (mg $\text{O}_2\text{L}^{-1}$ )	4238	690
DQO solúvel (mg $\text{O}_2\text{L}^{-1}$ )	3838	352
NTK (mg $\text{L}^{-1}$ )	2790	115
Nitrogênio Amoniacal (mg $\text{L}^{-1}$ )	2730	96
Nitrogênio Orgânico (mg $\text{L}^{-1}$ )	60	19
Sólidos Totais (mg $\text{L}^{-1}$ )	11407	997
Sólidos Suspensos Totais (mg $\text{L}^{-1}$ )	577	347
Sólidos Suspensos Voláteis (mg $\text{L}^{-1}$ )	330	312
Fósforo Total (mg $\text{P L}^{-1}$ )	17,0	8,3
Ortofosfato (mg $\text{P-PO}_4^{3-}\text{L}^{-1}$ )	13,0	3,5

Fonte: Dados de pesquisa.

Considerando as magnitudes apresentadas para o ED na Tabela 2, constata-se que os parâmetros químicos que caracterizam o esgoto como forte são: DQO total (690 mg  $\text{O}_2\text{L}^{-1}$ ), NTK (115 mg  $\text{N.L}^{-1}$ ),  $\text{N-NH}_4^+$  (96 mg  $\text{N.L}^{-1}$ ) e sólidos totais (997 mg $\text{L}^{-1}$ ). 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<sup>-</sup>), carbonatos (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) e bicarbonatos (HCO<sub>3</sub><sup>3-</sup>), 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<sup>-1</sup>) correspondendo assim a 98% de N<sub>total</sub>, fornecendo nesta contextualização, um bom aporte de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 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.

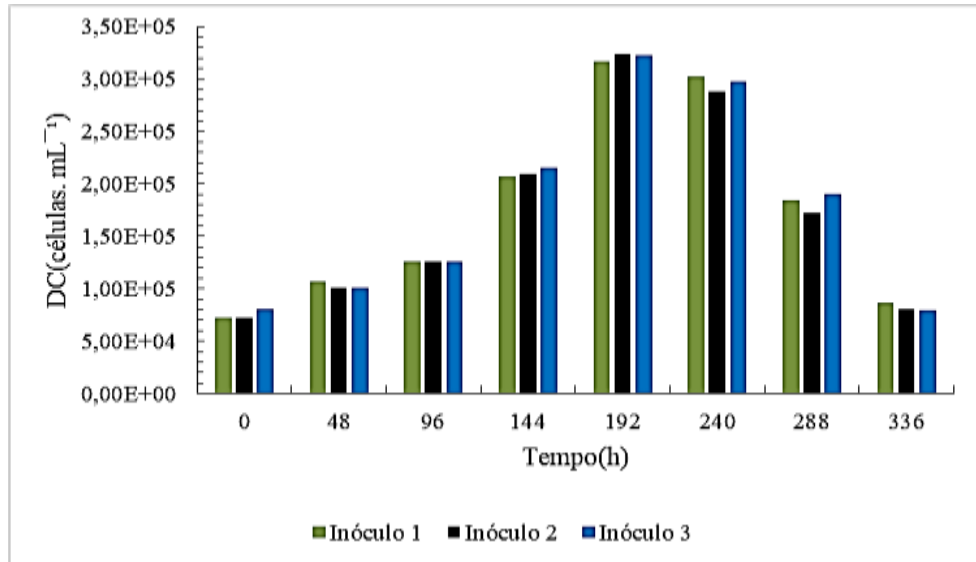
### **3.2 Curva de crescimento da *Chlorella* sp.**

Ao analisar a curva de crescimento da *Chlorella* sp. (Figura 1), 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 1,03x10<sup>5</sup> célula mL<sup>-1</sup>. A maior densidade registrada foi 3,24x10<sup>5</sup> a 192h, representando um incremento de 431% em relação ao T<sub>0</sub>.

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<sub>2</sub> no meio, como consequência da fotossíntese algácea. Os valores de cada ponto para os 3 inóculos estão apresentados na Figura 1.

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

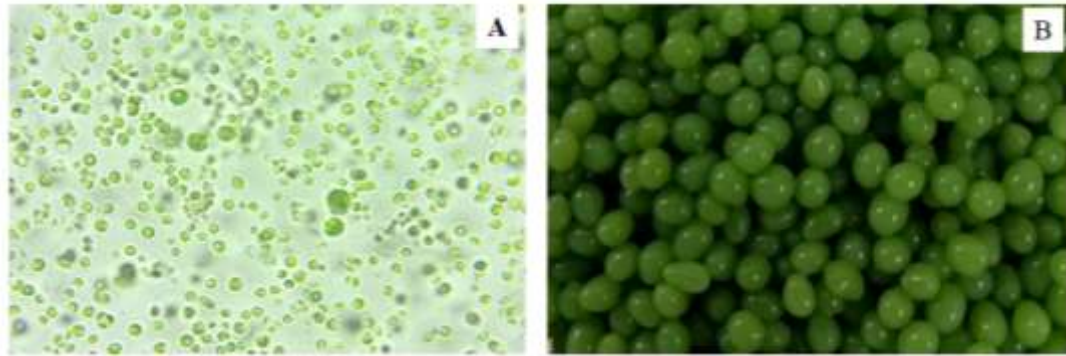


Fonte: Dados de pesquisa.

Entre o 8º e o 9º 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<sup>-1</sup>. 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, cultivada em meio de cultura MBB, ampliação de 400× e (2-B) *Chlorella* sp. imobilizada em esferas alginato de cálcio.



Fonte: Dados de pesquisa.

As microalgas foram imobilizadas no 8º dia de cultivo, considerando-se que a cepa estava em sua melhor condição fisiológica e morfológica. As esferas de alginato de cálcio após preparo foram medidas usando paquímetro e apresentaram 85% de cada alíquota produzida apresentou 4 mm de diâmetro.

### 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<sub>2</sub>, 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.

A análise do pH em biorreator alimentado por ED+LAS na proporção 19:1 e concentração afluente de 260 mg.L<sup>-1</sup>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<sup>-</sup>) acarretando um aumento do pH (Mota e Von Sperling, 2009; LI et al., 2011).

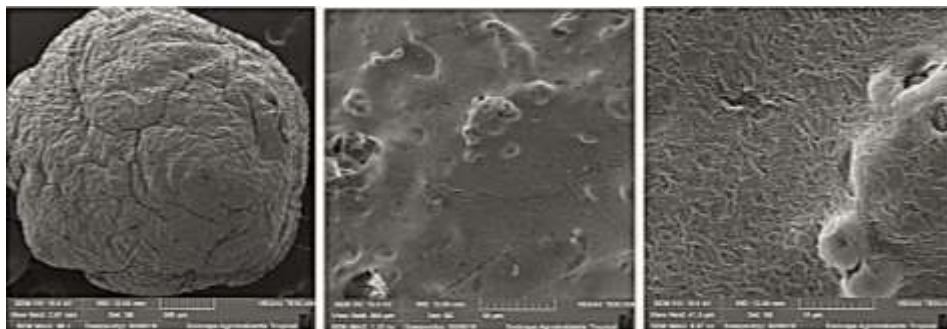


Nos biorreatores com *Chlorella* sp. imobilizada em esferas AG/QT, na 1<sup>a</sup> hora de tempo de contato, identificou-se uma queda significativa no pH, provavelmente por conta da quitosana ser um polímero apenas solúvel em um ácido fraco, que neste caso foi usado o ácido acético P.A a 2,0 % e 1,0 % (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%.

### 3.4 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. Na Figura 3 estão apresentadas as micrografias das esferas com algas imobilizadas em diferentes aumentos.

**Figura 3.** Micrografia da superfície de esfera com *Chlorella* sp. em aumentos de 500, 50 e 10  $\mu\text{m}$ .



Fonte: Dados de pesquisa.

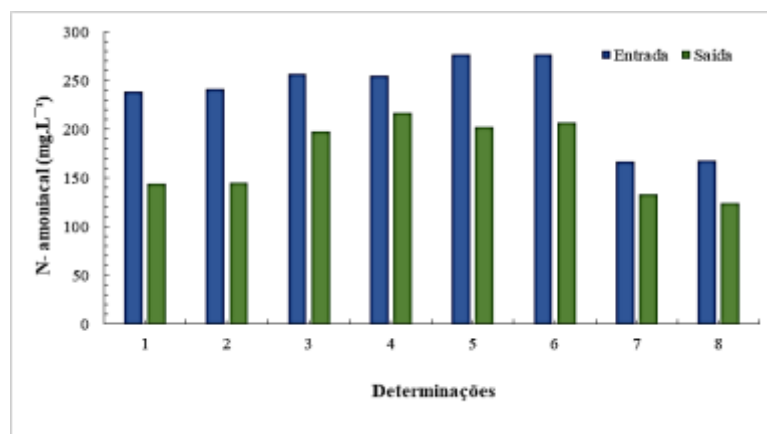
Corroborando com os dados apresentados na Figura 3, Sian (1984), trabalhando com *Chlorella vulgaris* imobilizada em esferas de alginato na remoção de amônia apresentou resultados de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da estrutura interna da esfera, indicando que as células algáceas são revestidas pelo polímero.

### 3.5 Etapa I - remoção de N- amoniacal de ED+LAS 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 mg. L<sup>-1</sup> 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 mg. L<sup>-1</sup> 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<sub>4</sub><sup>+</sup> 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<sup>+</sup>, o que pode reduzir o pH do meio. Na Figura 4 estão apresentados os valores de remoção de nitrogênio amoniacal em biorreatores com *Chlorella* sp. imobilizada em esferas AG/QT.

**Figura 4.** Remoção de amônia em biorreatores AG/QT com TDH de 4 h.



Fonte: Dados de pesquisa.

Alguns estudos com microalgas registraram queda do pH. Khanzada et al. (2018) cultivando *Chlorella vulgaris* e *Chlamydomonas reinhardtii* no tratamento de lixiviado, 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%.

*Otimização do TDH e % de LAS no substrato para maximização da remoção de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>*

A Tabela 3 apresenta os dados da ANOVA do DOE 2<sup>(2-0)</sup> obtidos para o monitoramento de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

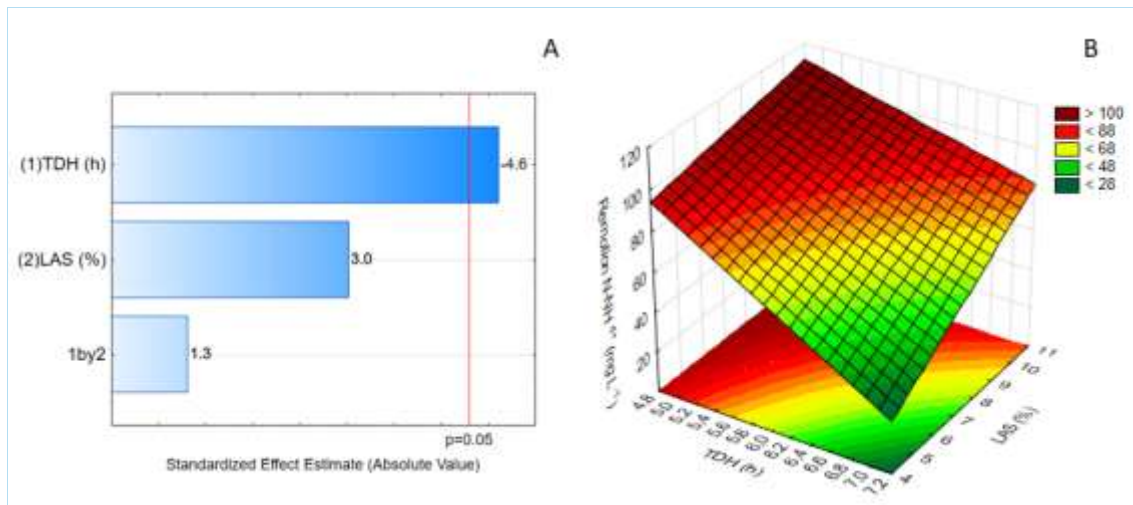
**Tabela 3.** ANOVA DOE 2<sup>(2-0)</sup> com replicata do ponto central para o monitoramento de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

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

Fonte: Dados de pesquisa.

A Figura 5 apresenta, respectivamente, o diagrama de Pareto e a Superfície de Resposta para o mesmo conjunto de dados.

**Figure 5.** Diagrama de Pareto e Superfície de resposta do DOE  $2^{(2-0)}$  obtidos para o monitoramento de  $\text{N-NH}_4^+$ .



Fonte: Dados de pesquisa.

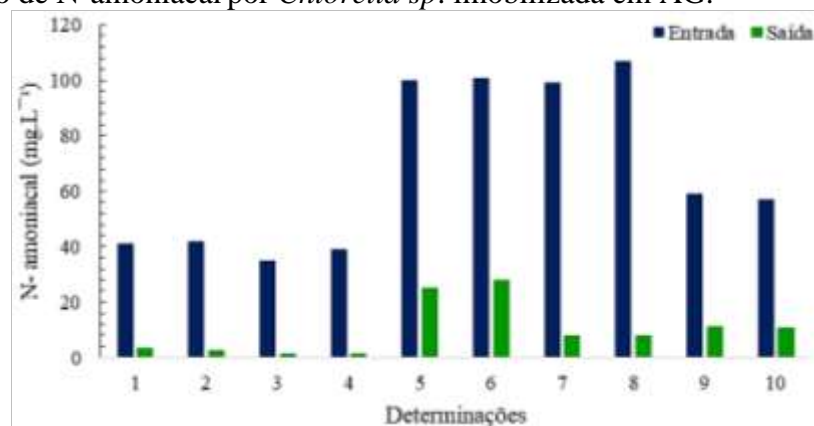
Conforme dados da ANOVA (Tabela 3) e diagrama de Pareto (Fig. 6-A), apenas o tempo exerceu influência estatística significativa sobre a remoção de  $\text{N-NH}_4^+$ . Além disso, a interação entre variáveis dependentes (Tempo e %LAS) não exerceu influência sobre o parâmetro monitorado, explicando que, independentemente do nível de LAS, a relação estabelecida entre tempo e remoção de  $\text{N-NH}_4^+$  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  $\text{N-NH}_4^+$  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  $\text{N-NH}_4^+$  é otimizada.

O resultado obtido a partir dos ensaios de remoção de N- amoniacal em TDH de 4 e 5h com concentrações afluentes médias respectivas de 273 e 281  $\text{mg.L}^{-1}$  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.

### 3.6 Etapa II- remoção de nitrogênio amoniacal de ED+LAS por *Chlorella sp.* imobilizada em 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 6 estão apresentados os resultados de remoção de N-amoniacal no biorreator com *Chlorella sp.* imobilizada.

**Figura 6.** Remoção de N-amoniacal por *Chlorella sp.* imobilizada em AG.



Fonte: Dados de pesquisa.

Conforme constata-se na análise da Figura 6, foram registradas remoções expressivas de N-amoniacal em todas as concentrações afluentes testadas. 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-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e do TDH na remoção de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>*

Na Tabela 4 estão apresentados os dados da ANOVA do DOE 2<sup>(2-0)</sup> obtidos para o monitoramento de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. A Figura 8 apresenta, respectivamente, o diagrama de Pareto e a Superfície de Resposta para o mesmo conjunto de dados.

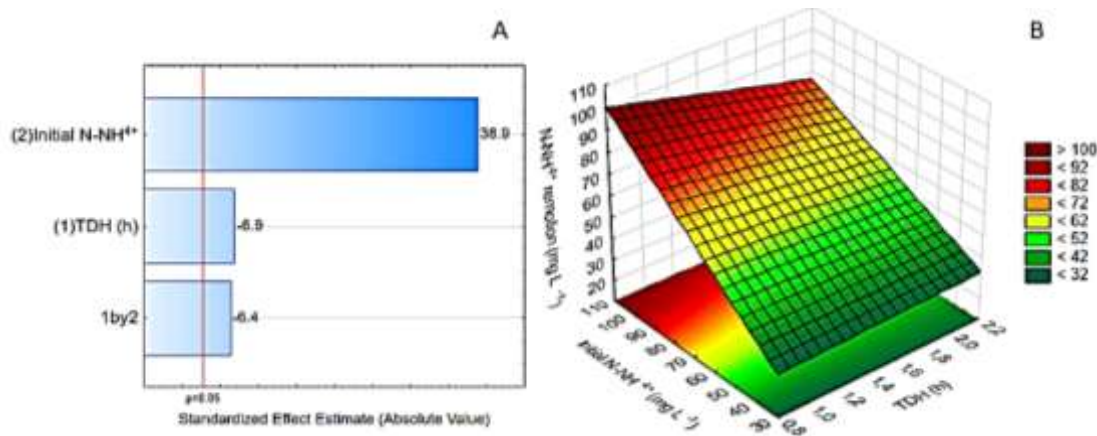
**Tabela 4.** ANOVA DOE 2<sup>(2-0)</sup> com duas replicatas para o monitoramento de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

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

Fonte: Dados de pesquisa.

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<sub>4</sub><sup>+</sup> exerceram influência significativa na remoção final de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (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<sub>4</sub><sup>+</sup> exerce 5,6 vezes mais influência que o TDH sobre o parâmetro monitorado. Em adição, a interação entre TDH e N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> também foi significativa, indicando que o TDH exercerá um efeito diferente para cada nível de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> afluyente. Na Figura 7: Diagrama de Pareto e a Superfície de Resposta para a monitoração da remoção de N- amoniacal no sistema.

**Figura 7.** Diagrama de Pareto e Superfície de resposta do DOE  $2^{(2-0)}$  obtidos para o monitoramento de  $N-NH_4^+$ .



Fonte: Dados de pesquisa.

Para um nível de confiança de 95% e  $R^2$  0,997, o modelo matemático obtido para a superfície de resposta (Fig.7-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.

### 3.7 Etapa III- remoção de N-amoniaco de LAS por *Chlorella* sp. imobilizada

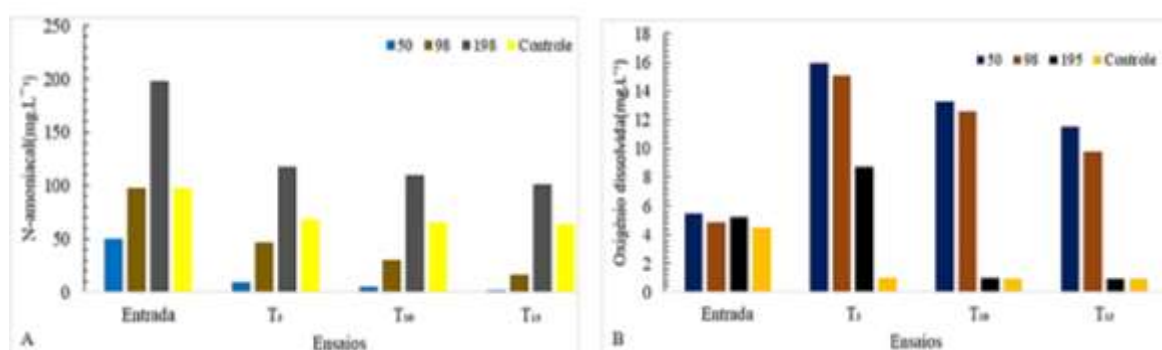
Nos experimentos tendo como substrato o LAS diluído em água destilada, foram registradas remoções de nitrogênio amoniacal que variaram entre 49 e 98% em TDH de 360 h. A maior eficiência foi registrada no biorreator com concentração afluente de N- amoniacal na faixa de 50  $mg.L^{-1}$ , atingindo remoção 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 *Nannochloropsi* 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<sup>-1</sup> de nitrogênio amoniaco 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<sub>4</sub><sup>+</sup>, 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- amoniaco média de 98 mg.L<sup>-1</sup>. Foi registrado até o 5<sup>o</sup> 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<sup>-1</sup>. 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 8, os dados de remoção de N-amoniaco estão apresentados e incremento de oxigênio dissolvido nos diferentes tratamentos.

**Figura 8.** Comportamento temporal da remoção de N-amoniaco e síntese de oxigênio dissolvido nos diferentes tratamentos.



Fonte: Dados de pesquisa.

Nos ensaios que estão apresentados na Figura 8, 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 obliquos* imobilizado em alginato de cálcio quando foi cultivado em águas residuárias ricas em  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ , atingindo valor de  $566 \text{ mg.g}^{-1}$  em água residuária com  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  afluente. O biorreator com  $98 \text{ mg.L}^{-1}$  de N-amoniaco afluente apresentou maior quantidade de esferas com a característica mencionada, sugerindo maior concentração de Clorofila *a*.

Os resultados obtidos na presente pesquisa, 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 nitrogênio amoniacal afluente de 50, 98 e  $198 \text{ mg.L}^{-1}$  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  $98 \text{ mg.L}^{-1}$  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.

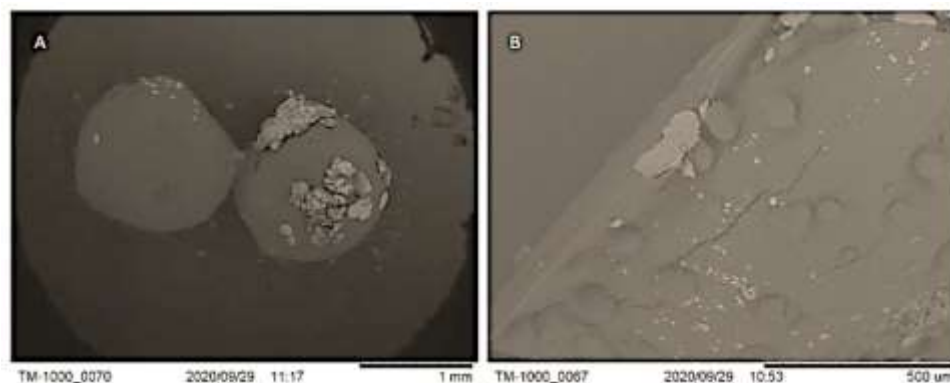
O pH monitorado em todos os sistemas se manteve na faixa de 7,2, favorecendo então, a predominância do  $\text{NH}_4^+$  em relação ao  $\text{NH}_3$ . O resultado deste parâmetro nos possibilita inferir que, o N-amoniaco removido não foi por *Stripping* de amônia, condição que ocorre em pH elevado, outrossim, pela assimilação microalgácea e por adsorção na matriz polimérica.

### **3.8 Análise da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS) das esferas produzidas**

A análise de MEV da superfície 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- amoniaco testadas, fato este, não observado nas esferas antes do recheio do biorreator para início dos ensaios. Este resultado é consistente com Sian (1984) que em seus resultados de MEV com microalgas imobilizadas, identificou a presença de poros na 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 testadas foi identificada a presença de carbono, oxigênio, cálcio, alumínio, mercúrio, cloro, fósforo, silício e enxofre. Este fato pode ser explicado pois, uma vez que com a assimilação de N- amoniacal, houve o aumento na densidade da *Chlorella* sp. Na Figura (9-A) está apresentada a análise de MEV da superfície externa de esferas com algas immobilizadas antes dos ensaios e (9-B) após o ensaio, apresentando células em sua superfície.

**Figura 9.** MEV de superfície de esferas com algas immobilizadas de entrada (aumento de 60x) e saída do sistema em aumento de 200x.



Fonte: Dados de pesquisa.

Os resultados apresentados pelas microanálises de MEV e EDS apontam o alginato como uma matriz polimérica eficiente na preservação da microalga durante o processo fitorremediativo de águas residuárias.

#### 4. Considerações Finais

- A *Chlorella* sp. isolada do lixiviado de aterro sanitário, apresentou rápida aclimatação 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, não sendo recomendada sua aplicação na imobilização celular visando o tratamento de águas residuárias;

- 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- amoniacal de LAS diluído em esgoto doméstico para todas as faixas testadas (41 a 107 mg.L<sup>-1</sup>), 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- amoniacal 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-amoniacal que sabidamente, é o principal contaminante que dificulta o tratamento biológico deste resíduo líquido. Entretanto, sugere-se o estudo de biorreatores com geometria que favoreçam e tornem mais eficiente o processo fotossintético das microalgas.

## Referências

American Public Health Association - APHA. (2012). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington, (22a ed.).

Bakraouy, H., Souabi, S., Digua, k. (2017). Optimization of the treatment of an anaerobic pretreated landfill leachate by coagulation–flocculation process using experimental design methodology. *Process safety and environment protection*, (109), 621–630.

Bischoff, H. W., Bold, H. C. (1963). *Physiologic studies. IV. Some algae from enchanted rock and related algae species*. University of Texas Publications,(6318),1-5.

Blank, C. E., Parks, R. W., Hinman, N. W. (2016) "Chitin: a potential new alternative nitrogen source for the tertiary, algal-based treatment of pulp and paper mill wastewater," *Journal of applied phycology*, 28(5), 2753-2766.

Bligny, R., Gout, E., Kaiser, W., Heber, U., Walker, D., Douce, R. (1997). 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*. 1320(2), 145- 152.

Borowitzka, M. A. (1988). *Microalgal Biotechnology Cambridge*. University Press. Cambridge.

Britto, D. T., Kronzucker. H. J. (2006). Futile cycling at the plasma membrane a hallmark low-affinity nutrient transport. *Trends plant sci*. 11(11), 529-534.

Chen-Lin, S., Cheng-Ann, C., Othman, B., Yii-Siang, H. (2017). 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*. 7, 1-7. ID 6951212 <https://doi.org/10.1155/2017/6951212>.

Collos, Y., Harrison, P. J. (2014) Acclimation and Toxicity of high ammonium concentrations to unicellular algae. *Elsevier. Marine Pollution Bulletin*. 80(1-2), 8-23.

Covarrubias, S. A., De-Bashan, L. E., Moreno, M and Bashan, Y. (2012) Alginate beads provide a beneficial physical barrier against native microorganisms in wastewater treated with immobilized bacteria and microalgae, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(6), 2669-2680.

Cuellar-Bermudez. S. P., Aleman-Nava. G. S., Chandra. R., Garcia-Perez. J. S., Contreras-Angulo. J. R., Markou. G., Muylaert. K., Rittmann. B. E., Parra-Saldivar. R. (2017). Nutrients utilization and contaminants removal. a review of two approaches of algal and cyanobacteria in wastewater. *Algal research*. 24(12) 438-449.

Ehrig, H. J. (1983). Quality and quantity of sanitary landfill leachate. *Waste management & research*, (1), 53-68/ <https://doi.org/10.1177/0734242X8400200116>.

Fierro, S., Del Pilar Sánchez-Saavedra, M., Copalcúa, C. (2008). "Nitrate and phosphate removal by chitosan immobilized *Scenedesmus*," *Bioresource Technology*, 99(5), 1274–1279.

Garcia, L. M., Gariépy, Y., Barnabe, S., Raghavan, V. (2020). Biorefinery of microalgae biomass cultivated in wastewaters. *Science Direct*. (7), 149-180/  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818996-2.00007-7>.

Giordano, M., Norici, A., Forssen, M., Eriksson, M., Raven, J. A. (2003). An anaplerotic role for mitochondrial carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 132 (4), 2126–2134.

Guerrero III, R. D., Villegas, C. T. (1982). *Report of the training course on growing food organism for fish hatcheries*. Philippines, South China Sea Fisheries Development/Coordinating Programam.

Heggers, G. R. V. N., Yadavalli, R. (2014). Two Stage treatment of dairy effluent using immobilized *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*. (11), 11-36. doi: 10.1186 / 2052-336X-11-36.

Jia, H., & Yuan, Q. (2016). Removal of nitrogen from wastewater using microalgae and microalgae–bacteria consortia. *Cogent Environmental Science*. 2(1). DOI: 10.1080/23311843.2016.1275089.

Kas, H. S. (1997). Chitosan: properties, preparation and application to microparticulate coupled with wastewater treatment for biofuel generation. *Renewable and Sustainable. Journal Microencapsul*. 14(6), 689-711.

Khanzada, Z. T., Övez, S. (2018). Growing Fresh Water microalgae in High Ammonium Landfill Leachate. *American Journal of Mechanics and Applications*. 6(2), 50-61.

Klochenko, P. D., Grubinko, V. V., Gumenyuk, G. B., Arsan, O. M. (2003). Peculiarities of ammonium nitrogen assimilation in green and blue-green algae. *Hydrobiol. Journal*. 39 (6), 102-108.

Koche, J. C., *Fundamentos de Metodologia Científica- Teoria da ciência e iniciação à pesquisa*. (2011) Editora Vozes. Petrópolis –RJ.

Leite, V. D., Oliveira, A. G., Campos, A. R. C., Sousa, J. T., Lopes, W. S., Oliveira, E. G. (2017). Tratamento conjugado de lixiviado de aterro sanitário e esgoto doméstico em lagoas de estabilização. *Revista DAE*. 77-93. DOI: 10.4322/dae.2016.036

Li, Y., Chen, Y. F., Chen, P., Min, M., Zhou, W., Martinez, B., Zhu, J., Ruan, R. (2011). Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrate municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. *Bioresource Technology*, 102(8), 5138–5144.

Libânio, M. *Fundamentos de Qualidade e Tratamento de Água*. (2016). Campinas. SP: Editora Átomo, (4a ed.), 550.

Liu, X., Wang, Z. J., Wang, J., Wu, J., Peng, F. (2019). Ammonium removal potential and its conversion pathways by free and immobilized *Scenedesmus obliquus* from wastewater. *Bioresource technology*. 283,184-190. DOI: 10.1016 / j.biortech.2019.03.038.

Lu, Y., Xu, S., Jiang, Z., Yuan, W., Wang, T. (2005). Diffusion of Nicotinamide Adenine Dinucleotide in Calcium Alginate Hydrogel Beads Doped with Carbon and Silica Nanotubes. *Journal. Chem. Eng. Data*. 50(4), 1319-1323.

Mojiri, A., Ziyang, L., Hui, W., Ahmad, Z., Tajuddin, R. M., Abu, S. S., Kindaichi, T., Aziz, H. A, Farraji, H. (2017). Concentrated landfill leachate treatment with a combined system including electro-ozonation and composite adsorbent augmented sequencing batch reactor process, *Process Saf. Environ*. 111, 253–262. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.07.013>

Monteiro, V. E. D. *Análises física, químicas e biológicas no estudo do comportamento do Aterro da Muribeca*. Veruschka Escarião Dessoles Monteiro- Recife- 2003. 232 fls. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Universidade Federal de Pernambuco.

Mota, F. S. B., Von Sperling, M. (Org.). (2009). *Nutrientes de Esgoto Sanitário: utilização e remoção*. Rio de Janeiro: ABES, 428p.

Mustafa, E. M., Phang, S. M., Chu, W. L. (2012). Use of algal consortium of five algae in the treatment of landfill leachate using the high-rate algal pond system. *J. Appl. Phycol.* 24(4), 953-963.

Peng, Y. (2013). Perspectives on technology for landfill leachate treatment. *Arabian Journal of Chemistry.* (79) DOI: 10.1016 / j.arabjc.2013.09.031.

Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parreira, F. J., Shitsuka, R. (2018). *Metodologia da Pesquisa Científica (free ebook)*. Santa Maria. RS.

Pradella, J. G. C., Schmidell, W., Lima, U. A., Aquarone, E., Borzani, W. (2001). Reatores com células imobilizadas. In: *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo: *Edgard Blücher*. 2(16), 355-372.

Przytocka-Jusiak, M., Mynarczyk, A., Kulesza, M., & Mycielski, R. (1977). Properties of *Chlorella vulgaris* strain adapted to high concentration of ammonium nitrogen. *Acta Microbiol. Pol.*, 26(2), 185-197.

Rendra, S., Warith, M. A., & Fernandes, L. (2007). Degradation of municipal solid waste in aerobic bioreactor landfills. *Environmental Technology*, v. 28, 609–620.

Ribeiro, A. J., Silva, C., Ferreira, D., Veiga, F. (2005). Chitosan-reinforced alginate microspheres obtained through the emulsification/internal gelation technique. *European Journal of Pharmaceutical Science.* 25(1), 31-40.

Salama, E. S., Hurade, M. B., Abou-Shanab, R. A.I., El-Dalatony, M. M., Yang, I. S., Min, B., Jeon, B. H. (2017). Recent progress in microalgae biomass production systems *Energy Reviews*, 79, 1189-1211.

Sian, R. (1984). 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.

Silva, M. C. C. P., Leite, V. D., Sousa, J. T., Pearson, H. W. (2017). *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.

Souto, B. A. G. *Lixiviados de Aterros Sanitários Brasileiros – Estudo de Remoção do Nitrogênio Amoniacal por Processo de Arraste com Ar (“stripping”)*. Gabriel D’arrigo de Brito Souto. São Carlos-2003. 371 fls. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento), Universidade de São Paulo.

Souto, G. D. B., Povinelli, J. (2007). *Características do lixiviado de aterros sanitários no Brasil*. In: *Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*. Belo Horizonte. Anais. ABES, 1-7.

Takeda, H. (1988). Classification of *Chlorella* strains by cell wall sugar composition. *Phytochemistry*. 27(12), 3823- 3826.

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

Thanoo, B. C., Sunny, M. C., Jayakrishnan, A. (1992). Cross-linked Chitosan microspheres: preparation and evaluation as a matrix for the controlled release of pharmaceuticals. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. London, 44(4), 283-286.

Valdez, C., Perenguez, Y., Matyas, B., Guevara, M, F. (2018). Analysis of removal of cadmium by action of immobilized *Chlorella sp.* microalgae in alginate beads. *Research-Open for Science*. 7(54). Doi: 10.12688 / f1000research.13527.1.

Wang, L., Ridgway, D., Gu, T., Moo-Young, M. (2005). Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. *Biotechnology Advances*, 23(2), 115-129.

Whitton, R., Santinelli, M., Pidou, M., Ometto, F., Henderson, R., Roddick, F., Jarvis, P., Villa, R., Jefferson, B. (2018). Tertiary nutrient removal from wastewater nutrient



characteristics and hydraulic retention time (TRH). *IWA PUBLISHING, Open Journal*, 1(1), 12-25.

Yazdani .M., Monavari, S. M., Omrani, G. A., Shariat, M., & Hosseini, S. M. (2015). Landfill sites suitability assessment by means of geographic information system analysis. *Solid Earth*, 6(3), 945–956.

Zhou, W., Chen, P., Min, M., Ma, X., Wang, J., & Griffith, R. (2014). Environment-enhancing algal biofuel production using wastewater. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 36, 256–269. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.073>.

Zhou, Z., Gui-Yin, L, I., Yuan-Jian., L, I. (2010). Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase on hybrid alginate-chitosan beads. *International Journal of Biological Macromolecules*. 47(1), 21-26.

#### **Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito**

Maria Célia Cavalcante de Paula e Silva - 30%

Valderi Duarte Leite - 20%

Maria Virgínia da Conceição Albuquerque - 15%

Amanda da Silva Barbosa Cartaxo - 10%

Railson de Oliveira Ramos - 15%

Wilton Silva Lopes - 10%