

ESTABILIDADE DO ALGINATO DE CÁLCIO COMO MATRIZ IMOBILIZANTE DA *Chlorella sp.* NO TRATAMENTO DE EFLUENTE SECUNDÁRIO.

Maria Célia Cavalcante de Paula e Silva (1); José Tavares de Sousa (2); Howard William Pearson (3); Valderi Duarte Leite (4)

(Universidade Estadual da Paraíba, celia_romulo@hotmail.com)

Resumo

A utilização de microalgas imobilizadas tem sido amplamente investigada no tratamento de águas residuárias para remoção de metais pesados, coliformes termotolerantes e nutrientes, notadamente N e o P. O alginato de cálcio é um polímero muito usado para imobilização de microalgas, por não ser tóxico, ter baixo custo e não comprometer de forma significativa, a fisiologia das células imobilizadas. Este trabalho objetivou investigar a estabilidade da matriz de alginato de cálcio em ensaios de bancada. Foram monitorados dez biorreatores tubulares de vidro transparente, em escala de laboratório. Destes, 6 (seis) de 0,1L de capacidade, 1 cm de leito fixo de fibra de vidro, e preenchidos por 0,6L de esferas, (19 esferas/mL de efluente). Também foram monitorados, 4 (quatro) biorreatores com capacidade volumétrica de 1,0L, cada um apresentava 1,5 m de comprimento, 30 mm de diâmetro, possuindo 3 cm de fibra de vidro sob o material suporte. O alginato de cálcio apresentou eficiência na remoção de fósforo nas concentrações de 2%, 4% e 6%, em sistemas de microalgas imobilizadas. Após 28 (vinte e oito) dias de monitoração, foram registradas desestruturações na matriz entre 10,4%, 22,4% e 38,5%. Os resultados são indicativos de que o fosfato presente no efluente nas concentrações entre 3,6 mgP/L a 10,3 mgP/L, bem como, a pressão mecânica recebida pelas esferas que ocupavam a região superior do biorreator, contribuíram para a instabilidade físico-química da matriz polimérica após 20 dias de operação, interferindo no resultado do experimento. Neste aspecto, se faz necessário o desenvolvimento de novas configurações geométricas para os biorreatores e técnicas que visem a melhoria na qualidade dos polímeros, de forma a aumentar sua resistência ao rompimento, bem como, a difusão das substâncias e passagem da luminosidade para a célula imobilizada.

Palavras-Chave: algas imobilizadas; alginato de cálcio, estabilidade de Alginato; *Chlorella sp.*

Introdução

A Biotecnologia consiste na utilização de sistemas e de componentes celulares para a obtenção de produtos e para o desenvolvimento de processos industriais. Trata-se de um campo de trabalho multidisciplinar e que encontra aplicações em todos os setores importantes da Economia (BORZANI et al., 2001).

O uso de microalgas na biotecnologia tem sido aumentado nos últimos anos, especialmente no tratamento das águas residuárias através da remoção de metais pesados, coliforme termotolerantes e nutrientes, nomeadamente nitrogênio e fósforo.

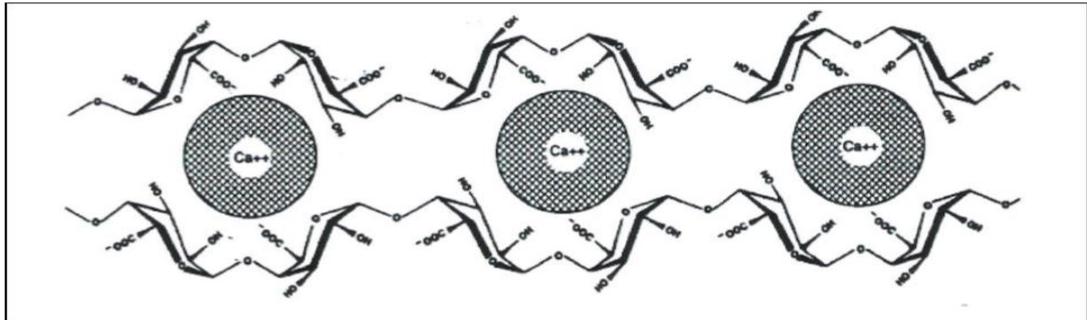
Os sistemas imobilizados representam a retenção de células ou enzimas em uma estrutura física insolúvel, o que as obriga a permanecerem em uma região particular do bioreator. A imobilização de microrganismos na forma de biofilmes, flocos e pellets é um fenômeno comum na natureza (PRADELLA, 2001).

O gel polissacarídeo mais comumente usado é o alginato, polímero extraído de algas marrons, principalmente de espécies dos gêneros *Laminaria* e *Sargassum* e das espécies *Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum* e *Lesonia negrescens*. O gel de alginato não é tóxico, tem baixo custo, possui alta afinidade pela água e as células não sofrem variações físico-químicas extremas durante o processo de imobilização (MORENO-GARRIDO, 2008). Na concepção de (GUO et al., 2006), o alginato é um polissacarídeo linear constituído por unidades de ácido manurônico ligado por ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4), e também por unidades de ácido gulurônico unidas por ligações do tipo α (1 \rightarrow 4). Esses resíduos estão arranjados na forma de blocos (M) e blocos (G), ligados de forma que a sequência destes resíduos na molécula sejam alternados.

Segundo Wang et al., (2005) o mecanismo clássico de imobilização por engaiolamento é a mistura de células microbianas com um composto polimérico que apresente cargas negativas, a exemplo do alginato de sódio. A técnica do engaiolamento em gel, consiste no confinamento físico de enzimas ou células em uma matriz polimérica formadora de gel. Sendo este, é o método mais utilizado para imobilização de células vivas (PRADELLA, 2001; MORENO-GARRIDO, 2008).

A geleificação do alginato é principalmente alcançada pela troca de íons por cátions divalentes, tais como Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} ou Mn^{2+} . Existe uma vasta concordância que a rede de gel, induzida pela ligação do íon Ca^{2+} e pela cadeia de segmentos do grupo G, formam junções estáveis (uma rede tridimensional) consistindo nos principais dímeros (ROY e GUPTA, 2004). Na Figura 01 apresenta-se o modelo químico de formação das esferas de alginato.

Figura 01- Modelo “Egg-Box”, para a formação do gel de alginato com íons de cálcio.



Fonte: CLARK; ROSS-MURPHY, (1987)

A tecnologia do processo de imobilização de microalgas em matrizes de alginato surgiu como uma importante técnica para aumentar a longevidade fotossintética e biocatalizadora celular (ROBINSON et al., 1985; MEGHARAJ et al., 1992). O gênero *Chlorella* Beijerinck pertence à classe Trebouxiophyceae, possui cerca de 14 espécies (Bicudo & Menezes, 2005) e é amplamente estudado em cultivo, tendo sido um dos primeiros com registro de cultivo em laboratório. (BEIJERINCK, 1890).

Kobbai et al., (2000) aplicaram técnicas de imobilização para duas microalgas verdes de água doce, *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella vulgaris* para tratamento de águas residuárias. Eles relataram 86 e 81% de remoção de fósforo e 100 e 98,4% de remoção de amônia nos dois reatores após 7 dias de tratamento.

Praveen e Loh (2015) encapsularam *Chlorella vulgaris* em esferas de alginato que foram adicionadas a um biorreator tratando águas residuárias sintéticas utilizando *Pseudomonas putida*. Os autores verificaram que durante a operação contínua, a eficiência de remoção em 500 mg / L de glicose, aumentou de 73% sem aeração para 100% na presença de microalgas imobilizadas.

Silva et al., (2017) monitoraram biorreatores tubulares alimentados em regime de batelada intermitente com efluente do filtro de areia contendo 6,3 mgP/L, recheados com *Chlorella sp.* imobilizada em esferas de alginato de cálcio em concentração de 2%, 4% e 6% sob luz contínua e temperatura de 27°C. Foram atingidas remoções máximas de 81% em 3 (três) horas de monitoração.

Diante do exposto, o presente estudo foi desenvolvido visando a obtenção de dados relativos ao uso e resistência físico-química da matriz de alginato de cálcio nos sistemas de algas imobilizadas em condições experimentais controladas.

Metodologia

O trabalho foi realizado nas dependências físicas da EXTRABES (Estação Experimental de Tratamento Biológico de Esgotos Sanitários), pertencente à Universidade Estadual da Paraíba, na cidade de Campina Grande – PB, Região Nordeste do Brasil (7°13'11''sul, 35°52'31'' oeste e 550 m acima do nível do mar).

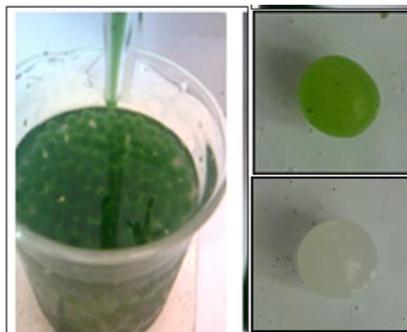
A Imobilização da Chlorella sp.

As cepas de *Chlorella sp* foram isoladas de uma série de 04 reatores de fluxo horizontal abertos, cada uma com dimensões de 1m de largura, 5m de comprimento e 0,5m de profundidade que tratavam lixiviado oriundo de aterro sanitário com alta concentração nitrogênio amoniacal. Foram cultivadas em frascos erlenmeyers de 2L, contendo 1600 ml de Meio Basal de Bolds (BISCHOFF, BOLD, 1963; BOROWITZKA, 1988) com inserção de aeração. Os frascos foram inoculados com 32 ml de microalgas com 8 dias de cultivo, e iluminados por lâmpadas fluorescentes com intensidade de fótons de aproximadamente $85 \mu E \cdot s^{-1} \cdot m^{-2}$.

Foi medida a massa de 4, 6 e 8 gramas de alginato de sódio usando balança Bioprecisa FA2104N, cada amostra foi dissolvida em 100 ml de água destilada e, em seguida, esterilizou-se em autoclave Phoenix; por 15 minutos a $121^{\circ} C$. Foram obtidas concentrações de alginato de sódio (4%,8% e 12%). Paralelamente 4,4 g de cloreto de cálcio foram diluídos para 100 ml de água destilada, solução, em seguida autoclavada por 15 minutos a $121^{\circ} C$ e utilizou-se na reação com o sedimento alga-alginato, para formação da esfera. Foram centrifugados 1000 ml de cultivo de *Chlorella sp.* a 3000 rpm e (FCR=950 g) durante 15 minutos, sendo o concentrado de microalgas misturado em alginato de sódio na proporção 1:1, para obter suspensões finais de 2%, 4% e 6% de alginato.

Essa suspensão alga-alginato, foi gotejada de uma bureta de 50 ml em 400 ml de CaCl_2 a 0,4 M com agitador Fanem Modelo 258 por 0,5 h para rigidez das esferas (beads), formadas, todas com aproximadamente 4 mm de diâmetro, medidas com uso de paquímetro. No caso das esferas formadas sem algas (controle), 4g de alginato foram dissolvidas em 100 ml de água destilada, procedendo-se a imobilização conforme descrito anteriormente, também controlando o diâmetro médio. Ao término, as esferas foram lavadas em água destilada, e mantidas imersas neste líquido, armazenadas na geladeira a 4^o C no escuro, para posterior enchimento das colunas. Na Figura 02 apresenta a solução alga-alginato sendo vertida no CaCl_2 , e amostras de beads (esferas) com e sem algas imobilizadas.

Figura 02- Solução alga-alginato sendo vertida no CaCl_2 / Amostras de beads de alginato, com e sem algas imobilizadas.



De cada amostra de esferas produzida, era separada uma alíquota de 200 unidades para medição do diâmetro. A amostra era considerada satisfatória quando 80% desta, cada esfera, estivesse com o diâmetro médio de 4 mm, volume de 33,5 mm³, 0,0380g de massa e aproximadamente 50 mm² de área superficial. Em cada 10 mL de esferas, contou-se entre 199 e 201 unidades.

Caracterização dos biorreatores e das condições de realização do experimento

Durante o período experimental, foram monitorados dez biorreatores tubulares de vidro pyrex transparente, em escala de laboratório. Destes, 6 (seis) de 0,1L de capacidade, tendo em

cada um, uma torneira na parte inferior, 1 cm de leito fixo de fibra de vidro, e estando preenchidos por 0,06L de esferas, aproximadamente $1,146 \times 10^3$ (19 esferas/mL de efluente).

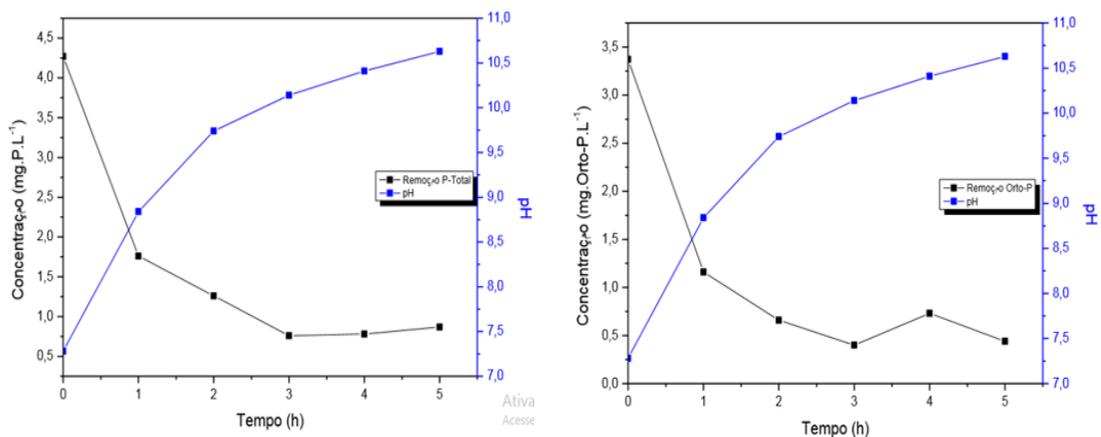
Também foram monitorados, 4 (quatro) bioreatores com capacidade volumétrica de 1,0L, cada um apresentava 1,5 m de comprimento, 30 mm de diâmetro, possuindo 3 cm de fibra de vidro sob o material suporte e duas torneiras, situadas em suas extremidades. Cada tubo, preenchido com 0,7L de esferas com algas imobilizadas, aproximadamente $1,2619 \times 10^4$ esferas (18 esferas/mL), com diferentes concentrações finais de alginato em suspensão (2%, 4% e 6%), estando conectado a uma bomba de pulso, modelo DHX MA/AD, através de uma mangueira de silicone de 40 cm, por sua extremidade inferior.

Os sistemas foram alimentados com efluente secundário, do filtro de areia e da fossa séptica em regime de batelada intermitente com tempo de contato de 3 e 5 horas, com coletas a cada hora, para avaliar a resistência da matriz imobilizante frente à remoção de fósforo. Ao final de cada ensaio, o biorreator foi esvaziado, as esferas lavadas com água destilada, este, envolvido completamente em papel alumínio até o próximo experimento num período médio de cinco (5) dias.

Resultados e Discussão

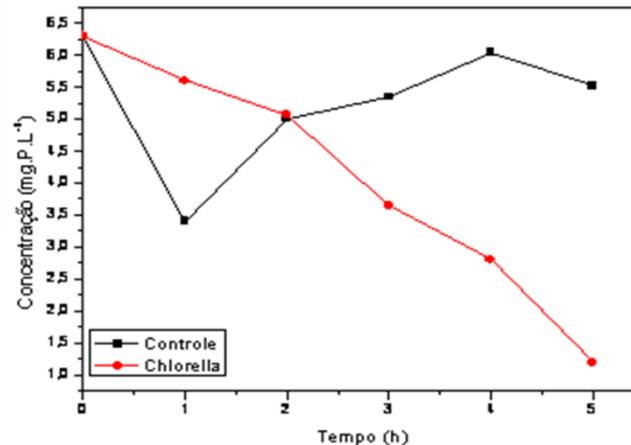
A matriz de alginato apresentou grande eficiência ao longo de todos os ensaios com os biorreatores de 0,1 L e de 1,0 L de capacidade, com algas imobilizadas ou mesmo nos controles (apenas alginato). Na Figura 03 está apresentada respectivamente o comportamento da remoção de fósforo total e ortofosfato solúvel em relação à elevação do pH no sistema.

Figura 03- Remoção de Fósforo total e ortofosfato em relação à elevação do pH em bioreatores de 0,1L.



Nos biorreatores de 1L com alginato de cálcio em concentração de 2%, a remoção atingiu remoções de 81% para as esferas com algas imobilizadas e 13% para as esferas controle em três (3) horas de contato. A Figura 04 são apresentados os dados de remoção de fósforo total deste biorreatores.

Figura 04- Remoção de Fósforo total em bioreatores com capacidade de 1L



Indicações de desestruturação da Matriz de Alginato

Após 28 dias de operação em batelada com efluente secundário e realização de 5 ensaios, o material suporte (alginato de cálcio) dos biorreatores de volume 1,0L, que estavam preenchidos aproximadamente 12619 esferas, apresentou sinais de desestruturação, dificultando a passagem do efluente na coleta, tornando seu efluente esverdeado, indicando que houve liberação de algas da matriz. Os biorreatores, B₁(esferas controle), B₂(esferas com algas imobilizadas a 6%) e B₃(esferas com algas imobilizadas a 2%), foram desmontados, foi coletada uma amostra de 50 esferas de cada um, exposta à temperatura ambiente em peneira fina por 30 minutos e em seguida, procedeu-se a medição de cada esfera usando-se um paquímetro. As esferas que no início dos ensaios apresentavam diâmetro médio de 4 mm estavam visivelmente reduzidas e com alta viscosidade na superfície. O resultado da nova medição das esferas de alginato após a desestruturação está apresentado nas Figura 05 e 06.

Figura 05- Desestruturação da matriz de alginato durante 28 dias de monitoração

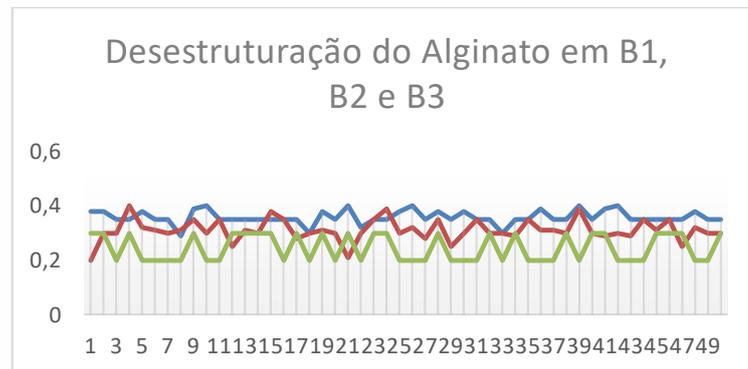


Figura 06- Beads de alginato(B₁, B₂ e B₃) em processo de desestruturação após 28 dias de monitoração



Nas esferas controle(B₁), houve um desgaste de 10,4%, nas esferas com algas imobilizadas com alginato à 6%, foi de 22,4% e para as esferas com algas imobilizadas a 2%, o percentual de desgaste foi 38,5%. Estes resultados podem ser explicados, pois, na concepção de Robinson et al., (1986), o gel de alginato depende essencialmente das condições iônicas do ambiente. Como resultado, a integridade do gel é altamente vulnerável à presença de agentes como, por exemplo, fósforo e citrato. Esses tipos de agentes, quando ligados a cátions de Ca²⁺, soltam a matriz de gel, que acaba por se dissolver, causando a perda de células alterando a experiência. Neste estudo foram utilizadas concentrações afluentes de fósforo que oscilaram entre 3,6 mgP/L a 10,3 mgP/L, o que já explicaria alta taxa de desestruturação.

Analisando-se as diferenças percentuais de desgaste entre as esferas controle e as esferas com algas imobilizadas, que submetidas às mesmas

condições apresentaram significativa diferença no percentual de desgaste. As esferas controle sofreram um percentual médio de desgaste de 10,4% com desvio padrão de 2%. Essa diferença provavelmente está relacionada à concentração do alginato, que, nas esferas controle encontra-se na concentração de 4% e nas esferas com microalgas na concentração de 2%. Corroborando com esse resultado, Lau et al., (1997) relataram que as concentrações de cálcio encontradas em águas residuárias de bioreatores contendo esferas de alginato, aumentaram consideravelmente após a realização do experimento.

Ainda deve ser considerado que as algas, que são seres aeróbios, podem ter migrado do interior da esfera para o meio externo, pois em condições de colmatação, na face inferior do bioreator, a penetração de oxigênio para a sobrevivência da microalga foi comprometida. Segundo Covizzi et al., (2007), uma aeração não uniforme pode ocasionar a migração das células da superfície interna da matriz de contenção para o meio externo e o consequente rompimento da matriz do gel, sendo esse um dos maiores problemas encontrados neste tipo de imobilização.

As esferas situadas na parte inferior estavam com sua morfologia alterada, compactando-se umas às outras. O bioreator foi retirado do suporte de alumínio, suas esferas foram agitadas ao longo do mesmo para facilitar a coleta da amostra. Este procedimento, pode ter liberado para o efluente, o fósforo adsorvido em experimentos anteriores, alterando o resultado final do ensaio. Segundo Kaya e Picard (1995), o atrito entre as esferas pode comprometer a capacidade de remoção de fosfato da água residuária pela microalga.

Os géis de alginato de cálcio estão sendo amplamente estudados no tratamento terciário de águas residuárias por sua não toxicidade, preço acessível e eficácia na remoção de nitrogênio e fósforo, uma vez que se apresentam quimicamente instáveis na presença de alguns componentes do meio de cultivo. Na concepção de Yoo et al., (1996), este problema tem sido contornado com o uso de sais de bário, no lugar do cálcio ou pelo tratamento com quitosana, para aumentar a resistência da matriz imobilizante.

Os biorreatores de volumes diferentes, com algas imobilizadas em concentração de alginato à 6%, apresentaram baixos índices de desestruturação, contudo seus valores de remoção de fósforo do efluente, foram significativamente menores em relação às esferas de 2% e 4%. Serp et al. (2000) avaliaram o efeito de uma dupla camada de gel na matriz pré-formada,

para prevenir o rompimento; entretanto, apesar de ter formado um núcleo celular que impediu que as células microbianas escapassem do seu interior, a dupla camada dificultou a difusão de O₂ e mostrou-se ineficiente como técnica de imobilização.

Conclusões

- O alginato de cálcio como matriz imobilizante para microalgas no tratamento de águas residuárias domésticas sofre desestruturação físico-química após 23 dias de monitoração;
- O Fósforo presente nos efluentes e a pressão recebida pelas esferas localizadas na parte superior dos biorreatores são as principais causas para a instabilidade das esferas de alginato.

Referências

BEIJERINCK, M.W. 1890. **Culturversuche mit zoochlorellen, lichengonidien und anderen niederen algaen.** Botanische Zeitung. 48:725-785.

BICUDO, C. E. de M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil – chave para identificação e descrições.** São Carlos-SP: Editora RiMa, 2005. 489p.

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

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

CLARK, A. H.; ROSS-MURPHY, S. B.; **Brit. Polym J.** 1987, 17, 164

COVIZZI, L. G.; GIESE, E. C.; GOMES, E.; DEKKER, R.F.H.; SILVA, R. **Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas.** Semana: Ciências Exatas e Tecnológicas, n. 2, p. 143 – 160. Londrina, jul./dez., 2007.

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

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

KOBBAI, I., A.E. DEWEDAR, O. HAMMOUDA, M.S. ABDEL HAMEED and E. MAY, 2000.
Immobilized algae for wastewater treatment. Proc. 1st Int. Conf. Biol. Sci. (ICBS) Fac. Sci. Tanta University, 1: 114–22

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

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

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

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

PRAVEEN, P., LOK, K.-C., 2015, **Photosynthetic aeration in biological wastewater treatment using immobilized microalgae-bacteria symbiosis.** Applied microbiology and biotechnology, 1-10.

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

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

SERP, D.; CANTANA, E.; HEINZEN, C.; VON STOCKAR, U.; MARISON, I. W. **Characterization of an encapsulation device for the production of monodisperse alginate beads for cell immobilization.** Biotechnology and Bioengineering, New York, v. 70, n. 1, p. 41-53, 2000.

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

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

YOO, I-K.; SEONG, G. H.; CHANG, H. N.; PARK, J. K. **Encapsulation of Lactobacillus casei cells in liquid-core alginate capsules for lactic acid production.** Enzyme and Microbial Technology, New York, v. 19, n. 5, p. 428-433, 1996.