



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
SANITÁRIA

ALEXANDRE ENDRES MARCON

REMOÇÃO DE COLIFORMES FECAIS COM MICROALGAS
(*Chlorella*) IMOBILIZADAS EM MATRIZ DE ALGINATO DE
CÁLCIO.

Prof. Dr. Henio Normando de Souza Melo (PPgES/UFRN – orientador)

Prof. Dr. Howard William Pearson (PPgES/UFRN – co-orientador)

Natal

2005

Divisão de Serviços Técnicos

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Central Zila Mamede

Marcon, Alexandre Endres.

Remoção de coliformes fecais com microalgas (*Chlorella*)
imobilizadas em matriz de Alginato de cálcio / Alexandre Endres
Marcon. - Natal, RN, 2005.
62 f. : il.

Orientador: Henio Normando de Souza Melo.

Co-orientador: Howard William Pearson.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do
Norte. Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia Civil.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Sanitária.

1. Água – Tratamento – Tese. 2. Remoção de coliformes fecais –
Microalgas – Tese. 3. Microalgas (*Chlorella*) – Tese. 4. Alginato de
cálcio – Tese. I. Melo, Henio Normando de Souza. II. Pearson, Howard
William. III. Remoção de Coliformes Fecais com Microalgas
(*Chlorella*) Imobilizadas em Matriz de Alginato de Cálcio.

RN/UF/BCZM

CDU 628.1 (043.2)



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
SANITÁRIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

REMOÇÃO DE COLIFORMES FECAIS COM MICROALGAS (*Chlorella*)
IMOBILIZADAS EM MATRIZ DE ALGINATO DE CÁLCIO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pesquisa e Pós-Graduação em Engenharia Sanitária, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Sanitária.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Henio Normando de Souza Melo (PPgES/UFRN – orientador)

Prof. Dr. Howard William Pearson (PPgES/UFRN – co-orientador)

Profa. Dra. Silvia Regina Batistuzzo de Medeiros (PPgGBM/UFRN – examinadora interna)

Prof. Dr. Salomão Anselmo Silva (PPgES/UFCG – examinador externo)

Avaliar é criar. O próprio avaliar constitui o grande valor e a preciosidade das coisas avaliadas.

F. W. Nietzsche

AGRADECIMENTOS

A minha esposa Paula Stein,
A minha mãe Nina Rosa Becker Endres por toda ajuda,
Aos meus orientadores Prof. Henio Normando de Souza Melo,
e Prof. Howard William Pearson,
Ao Prof. Duncan Mara,
A Ana Lia Pujato e ao Prof. Sebastião Ribeiro pela colaboração, e
A todos os meus colegas do Larhisa que colaboraram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 JUSTIFICATIVAS E RELEVÂNCIAS	11
2 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO PRINCIPAL	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 <i>CHORELLA</i>	13
3.2 MICROALGAS IMOBILIZADAS EM MATRIZ DE ALGINATO DE CÁLCIO	13
3.2.1 Polissacarídeos	15
3.3 COLIFORMES FECAIS.....	16
3.4 REMOÇÃO DE COLIFORMES FECAIS.....	17
3.5 TRATAMENTO CONVENCIONAL COM CLORO.....	19
3.5.1 Cloração	20
3.5.2 Métodos de Aplicação de Cloro.....	21
3.6 TRATAMENTO COM IRRADIAÇÃO ULTRAVIOLETA (UV)	22
3.6.1 Desinfecção e Esterilização com UV	23
3.6.2 Parâmetros da Qualidade da Água para Tratamento com UV	23
3.6.3 Transmissão da Irradiação UV	24
3.6.4 Projeto de Desinfecção com UV	24
3.6.5 Outras aplicações da Irradiação UV	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 MANUTENÇÃO DA CULTURA	27
4.2 IMOBILIZAÇÃO CELULAR	31
4.3 DESCRIÇÃO DO BIORREATOR E DO EXPERIMENTO	34
4.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS ALGAS	38
4.5 DETERMINAÇÃO DA REMOÇÃO DE COLIFORMES FECAIS	39
4.5.1 DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE DECAIMENTO DE COLIFORMES FECAIS (Kb).....	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1 TRATAMENTO SOB LUZ ARTIFICIAL.....	42
5.2 TRATAMENTO SOB LUZ SOLAR.....	48
6 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	54
REFERÊNCIAS	56
APÊNDICE.....	59
ANEXO	

LISTA DE SIGLAS

AHA	Ácido Haloacéticos
ANOVA	Análise de Variação
APHA	American Public Health Association
CF	Coliformes Fecais
ETE	Estação de Tratamento de Esgotos
Kb	Coeficiente Decaimento de Coliformes Fecais
IMP	Indicador Microbiológico de Patógenos
nm	Nanômetro
OD	Oxigênio Dissolvido
OMS	Organização Mundial da Saúde
rev./min	Reviravoltas por minuto
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SPD	Subproduto de Desinfecção
UFC	Unidade de Colônia Filtrada
THM	Trihalometanos

RESUMO

A contaminação das águas subterrâneas por efluentes domésticos e industriais é a principal causa de poluição ambiental e redução na qualidade dos recursos hídricos. *Escherichia coli* (coliformes fecais) é atualmente o melhor indicador biológico de contaminação microbiológica fecal da água de consumo humano e indica uma ameaça direta a saúde pública. Os processos convencionais de desinfecção geram subprodutos químicos perigosos e/ou carcinogênicos (ex. organoclorados). A tecnologia da imobilização de microalgas (*Chlorella*.) em matrizes de alginato de cálcio ("beads") aumenta a longevidade fotossintética, viabilidade, durabilidade e atividade biocatalizadora celular. Reduções significantes (>99%) ocorreram após 3h de contato dos afluentes (concentração média de 10^{11} UFC/100mL) com as colunas com microalgas ($3,5\mu\text{g. bead}^{-1}$) em relação aos reatores sem algas (controle). Desinfecção completa de CF (remoção superior a 10 log) foi observada após 12h de tratamento nos bioreatores (luz artificial) contendo microalgas (44 beads. mL^{-1} efluente). O coeficiente de decaimento de CF foi correlacionado com o tempo de contato superior à 3h ($K_b=3,5$) no modelo de fluxo pistão. Os dezesseis experimentos sob luz artificial ($85\mu\text{E. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), solar ($1,0\text{ kcal.cm}^{-2}.\text{d}^{-1}$) e escuro ($n=16$) foram realizados entre 01/12/2004 a 27/02/2005. Os principais processos envolvidos na redução das concentrações dos indicadores de contaminação fecal foram à atividade metabólica e de fotossíntese das microalgas. Remoções químicas e físicas por absorção dos géis de alginato de cálcio foram insignificantes.

Palavras-chave: Alginato, *Chlorella*, imobilização, redução de indicador microbiológico de patógenos.

ABSTRACT

The contamination of groundwater by domestic and industrial effluents is a principal cause of the reduction in the quality of water resources. The presence of *Escherichia coli* (faecal coliforms) is still the best indicator of faecal contamination of water used for human consumption and indicates a direct risk to public health. The conventional chemical disinfection processes (e.g. chlorination) generate potentially dangerous by-products some of which are carcinogenic (e.g. organo-chlorides). Immobilization of micro-algal cells of the genus *Chlorella* in a matrix of calcium alginate to form beads increased their photosynthetic longevity, viability, durability and rate of cellular uptake. Significant reductions in FC concentrations (>99%) occurred after 3h contact time between a culture of FC (originally isolated from waste stabilization pond effluent) and columns of algal beads. Control columns of alginate beads without algae showed no such reduction. Sixteen experiments were performed using artificial light ($85\mu\text{E. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), solar radiation ($1,0\text{ kcal.cm}^{-2}.\text{d}^{-1}$) light and dark conditions ($n=16$) between 01/12/2004 and 27/02/2005. Complete removal of FC (in this case the removal of >10 logs) was observed after 12h of treatment in the bioreactors of algal beads (44 beads mL^{-1} of liquid phase) illuminated with fluorescent tubes. A coliform die-off coefficient (K_b) of 3,5 was calculated using a plug flow model. The principal processes involved in the removal of FC were attributed to increased metabolic activity and photosynthetic activity by the algae immobilized in the alginate beads. Chemical and physical removal of FC by absorption on to the calcium alginate beads (i.e. control beads without *Chlorella*) was insignificant.

Key-boards: Alginate, *Chlorella*, immobilization, reduction of the indicator microbiologic pathogens.

* Contato com autores: Tel.: (84) 8817-2464, fax (84) 215-3770.

Endereço eletrônico: endresbio@yahoo.com.br (A.E. Marcon).

1. INTRODUÇÃO

A contaminação dos mananciais por efluentes domésticos e industriais é uma das principais causas da poluição ambiental e degradação dos recursos hídricos. O desenvolvimento urbano e o conseqüente adensamento populacional trouxeram a necessidade da eliminação das águas residuais provenientes das atividades sócio-econômicas. Inicialmente, estes efluentes eram lançados, sob a forma bruta, nos corpos de água (rios, lagos e mares) e no solo através das fossas sépticas e sumidouros. O lançamento *in natura* acarretou altos custos ambientais, sanitários e econômicos; decorrendo na mortalidade humana, diminuição da expectativa de vida, aumento nos gastos médicos, degradação ambiental, flagelo dos ecossistemas e queda da renda proveniente do turismo numa região degradada, entre muitos outros.

Os coliformes fecais, como a *Escherichia coli*, são reconhecidamente os melhores indicadores da contaminação por microorganismos patogênicos resultantes, principalmente, da poluição fecal (Baudisova, 1997). Os processos convencionais de remoção para desinfecção ou diminuição da concentração de patógenos e conseqüentemente seus indicadores, são efetivos, porém seus produtos químicos são perigosos e em alguns casos carcinogênicos, como o subproduto da reação do cloro (Cl^-) combinado com aminas residuais resultando em organoclorados (Sussuana, 2000).

Com a finalidade de minimizar estes impactos foram desenvolvidas formas de tratamentos para essas águas residuais, eliminando sua carga poluidora, principalmente através da utilização de microorganismos que se proliferam naturalmente no solo e na água, digerindo as matérias orgânicas e inorgânicas existentes nos dejetos e contaminantes, objetivando otimizar a eficiência e minimizar os custos. Neste sentido, o tratamento de águas residuárias provenientes de esgotos domésticos, através do sistema de lagoas de estabilização, é considerado uma das técnicas mais simples e eficientes, aliado ao baixo custo de implantação, operação e manutenção. Dependendo do tipo de lagoa do sistema, ou das séries de lagoas utilizadas, a remoção de microorganismos patogênicos pode ser de até 99,9999%, que corresponde a uma redução logarítmica de 10^6 na concentração desses patógenos e os coeficientes de decaimento (K_b) também são significativos.

As algas são um dos grupos mais diversificados de microorganismos existentes nas lagoas de estabilização, onde se verifica a predominância de algas verdes (*Chlorophyta*),

destacando-se as microalgas do gênero *Chlorella* sp., que são microorganismos unicelulares, clorofilados, sem flagelos e autotróficos (fotossíntese).

As algas desempenham um papel fundamental no funcionamento do sistema de lagoas, ou seja:

- Aumentam a concentração de oxigênio dissolvido (OD) através da fotossíntese, que é necessário ao metabolismo das bactérias aeróbias heterotróficas;
- Consomem o dióxido de carbono (CO_2) produzido pela oxidação bacteriana da matéria orgânica, elevando o pH do meio;
- Removem nutrientes da água através de seu metabolismo e crescimento celular.

Os esgotos domésticos caracterizam-se por concentrações de coliformes fecais de aproximadamente 10^{7-12} células/100mL. Num sistema composto por três lagoas em série existe redução de até 99,999% ($\log.10^{4-5}$) na concentração de coliformes fecais e relevante coeficiente decaimento.

O efluente final tratado secundariamente permanece com concentração elevada de microorganismos patogênicos (aprox. 10^{3-7} células/100mL). Em sistemas de filtros biológicos e lodos ativados a redução é de até 99% (Pearson *et al.*, 1987a; Davies-Colley, 1997; Mara & Pearson, 1999).

Já a filtração biológica com bioreatores com microalgas e Cianobactérias imobilizadas alginato de cálcio é uma técnica de tratamento terciário que capaz de reduzir significativamente os riscos de contaminação microbiológica e doenças vinculadas a patógenos do meio hídrico. Através desse tratamento com algas imobilizadas em concentração ideal de células e matriz de alginato obtêm-se redução significativa nas concentrações de microorganismos patogênicos (Megharaj *et al.*, 1992; Forrest, 1998; Page, 2000; Tam e Wong, 2000).

As bactérias patogênicas, bem como, os coliformes fecais, são removidos em sistemas biológicos, principalmente pelo biofilme das algas e a irradiação solar. Isto ocorre através de vários mecanismos, tais como: temperatura alta, luz ultravioleta, foto-oxidação, altos níveis de pH, lise e aderência à superfície celular das algas (Pearson, 1986).

A imobilização de microalgas em matrizes de alginato é uma tecnologia que oferece grande flexibilidade operacional e eficiência, pois impede que a biomassa algal seja levada para fora do biorreator, facilitando a sua remoção do sistema. Com a imobilização, as

algas distribuem-se aleatoriamente nas esferas da matriz de alginato (“beads”) e esta fixação aumenta a viabilidade celular por maiores períodos de tempo, quando comparados aos sistemas de tratamento de células não imobilizadas. Vários trabalhos (Robinson *et al.*, 1985; Megharaj *et al.*, 1992; Forrest, 1998; Page, 2000; Tam & Wong, 2000; de-Bashan *et al.*, 2002) têm demonstrado que esta técnica remove significativamente os coliformes fecais, vírus e nutrientes de águas residuárias provenientes de esgotos, sendo ainda inédita a sua aplicação no Brasil. Contudo, neste sistema biológico, a alta concentração de biomassa por “beads” prejudica o tratamento, ao contrário do que acontece em sistemas livres (lagoas de estabilização), onde altas concentrações de algas no meio aumentam a eficiência do tratamento.

1.1 JUSTIFICATIVAS E RELEVÂNCIAS

De acordo com a OMS (1989), 25 milhões de pessoas morrem por ano devido à falta de água potável e saneamento básico. No Brasil, a contaminação das águas por microorganismos patogênicos é um dos principais causadores das altas taxas de mortalidade infantil, acima de 100 mortes para cada 1000 nascimentos.

Devido ao crescente aumento demográfico, a cidade do Natal tem urgência em adotar políticas de preservação e uso racional dos seus recursos hídricos, para isto se faz necessário o uso de técnicas alternativas, como o tratamento biológico terciário com microalgas imobilizadas das águas residuais e esgotos, que ainda não foram utilizadas na região.

A desinfecção hídrica com cloro utiliza altas doses do produto (10 a 30mg/L de Cl_2), exige alto tempo de contato (30 a 60 minutos), é cara (aproximadamente 12 mil dólares para cada 1000 pessoas) e leva a bioacumulação de cloroaminas (organoclorados), que são substâncias potencialmente cancerígenas. Desta forma, o tratamento biológico terciário pode ser uma técnica mais eficiente, com menores custos e riscos à saúde humana e ao meio ambiente.

Este método é ideal para regiões de clima quente e com altas taxas de insolação. As temperaturas elevadas aceleram o metabolismo dos microorganismos patogênicos (CF), tornando-os mais suscetíveis, proporcionando maiores taxas de desinfecção em menores tempos de detenção.

O tratamento biológico terciário de efluentes infectados reduzirá os riscos de contaminação dos aquíferos e mananciais da região de Natal, onde deve ser priorizada a preservação dos recursos hídricos e do meio ambiente. É consenso entre os microbiologistas, que muitos microorganismos patogênicos têm sua sobrevivência aumentada nos solos, mesmo quando comparado ao cultivo em laboratório. Além disto, este tratamento terciário biológico aumentará as possibilidades de reúso dos recursos hídricos contaminados.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Promover a redução de indicadores de bactérias patogênicas entéricas (CF) de efluentes contaminados, através do tratamento biológico terciário com biorreatores de microalgas-verdes (*Chlorella* sp.) imobilizadas em matriz de alginato de cálcio.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comprovar a eficácia do tratamento biológico terciário na desinfecção de águas residuais através de microalgas imobilizadas.
- Determinar o percentual de remoção de coliformes fecais (CF) no efluente tratado nos reatores contendo microalgas verdes (gênero *Chlorella* sp.), em relação aos controles, e após os diferentes tempos de contato.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *CHLORELLA*

O gênero *Chlorella* é composto por microalgas verdes, unicelulares, que possuem clorofila e realizam fotossíntese, sendo uma das primeiras algas a serem isoladas como uma cultura pura (realizado por Beijerinck na década de 1890). Otto Warburg (1919) introduziu o uso de *Chlorella* sp. nos estudos da fotossíntese, onde as células eram cultivadas numa solução similar a solução Knop's, que era utilizada no cultivo hidropônico de plantas superiores. Essa solução continha $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, MgSO_4 , KH_2PO_4 , KNO_3 (ou KCl) e FeCl_3 diluídos em água da torneira.

No final de 1940, aumentou-se a atenção científica sobre o potencial das microalgas na produção de biomassa. As algas, principalmente do gênero *Chlorella*, foram cultivadas em meio mineral definido, e após eram determinados os requerimentos ambientais e nutricionais das diversas espécies (Krauss, 1958; Bowen et al., 1965).

O gênero *Chlorella* apresenta 5% de eficiência média na conversão de energia luminosa em material celular, correspondendo a uma produção de biomassa de 3,5g de (peso seco) $\text{m}^{-2}.\text{dia}^{-1}$ (Myers, 1980). Quando fornecida concentração de 1g de $\text{KNO}_3.\text{L}^{-1}$ é possível a produção de 2g. L^{-1} de peso celular seco. Mesmo sob meio pobre em nitrogênio, esse gênero apresenta uma boa produção de biomassa, desde que em ambientes com temperatura elevada e boa luminosidade (Megharaj et al., 1992).

3.2 MICROALGAS IMOBILIZADAS EM MATRIZ DE ALGINATO DE CÁLCIO

A tecnologia do processo de imobilização de microalgas em matrizes de alginato surgiu como uma importante técnica para aumentar a longevidade fotossintética e biocatalizadora celular (Robinson et al., 1985; Megharaj et al., 1992). Esta tecnologia não previne apenas que a biomassa seja levada para fora dos biorreatores, mas também oferece um

grande avanço na flexibilidade operacional e na fácil separação das algas dos efluentes tratados (Mallick & Rai, 1993). Vários trabalhos indicam remoção de bactérias entéricas patogênicas, coliformes fecais, vírus, nitrogênio, fósforo, metais, biocidas e outros compostos químicos de afluentes contaminados através de culturas de microalgas submetidas ao fluxo contínuo ou não, bem como, demonstraram uma significativa redução dos patógenos e nutrientes nos biorreatores sob condições ideais (Sian, 1984; Meghharaj *et al.*, 1992, Lau *et al.*, 1997; Page, 2000; Tam & Wong, 2000; de-Bashan *et al.*, 2002).

O alginato é um polissacarídeo bioativo produzido por algas marinhas marrons, principalmente as espécies do gênero *Fucus*, *Macrocystis* e *Laminaria*. Trata-se de um ficocoloíde com ácido algínico como princípio ativo, que contém ferro e cálcio na sua estrutura. Em 1880, foi isolado por lixiviação por E. Stanford e após começou a ser comercializado em 1929. Desde então, prosperam, por exemplo, com utilizações médicas, farmacêuticas, alimentícias e odontológicas (Srivastava & Kulshreshtha, 1989).

O sucesso no empreendimento de imobilizar microalgas para o tratamento de águas residuais depende de muitos fatores, incluindo a espécie algal, a matriz de imobilização, a concentração de células e esferas da matriz, morfologia das esferas (“beads”), aeração, tempo de retenção, e outros (Lau *et al.*, 1997; Tam & Wong, 2000; de-Bashan *et al.*, 2002).

De todas as espécies de microalgas unicelulares, o gênero *Chlorella* é o mais comum e efetivo na imobilização para a remoção de coliformes, nutrientes e metais, sendo também, tolerante à amplas variações de pH e concentração de sais. As células de *Chlorella* suportam concentrações de Mg e K até 10 vezes mais elevadas que as concentrações críticas, e de P, S e Mn até 100 vezes. Quando imobilizadas na matriz de alginato de cálcio (“beads”), as viabilidades celulares mantêm-se por um longo período de tempo e ao contrário do que acontece nos sistemas de tratamento com algas livres suspensas, concentração muita elevada de algas na matriz diminui a eficiência do tratamento (Sian, 1984; Robison *et al.*, 1985; Megharaj *et al.*, 1992; Mallick & Rai, 1993; Laliberté, *et al.* 1994; Rangeby, 1996; Lau *et al.*, 1997; Tam *et al.*, 2000; Tien, 2002;).

O fósforo e o nitrogênio são alguns dos nutrientes mais utilizados pelas plantas e são também um dos principais poluentes eutróficos. Muitos estudos têm mostrado a eficiência da cultura de microalgas imobilizadas na remoção destes nutrientes das águas residuais poluídas e ricas em compostos nitrogenados e fosfatados (Megharaj *et. al.*, 1992; Robinson *et al.* 1988). Os tratamentos de águas residuais e esgotos por microalgas têm sido usados também para remover coliformes, matéria orgânica e os nutrientes inorgânicos em muitas comunidades pequenas, isto devido ao seu baixo custo e alta eficiência.

É importante ressaltar, que muitas vezes os sistemas de tratamento secundários não são totalmente eficazes na remoção de nutrientes e coliformes, principalmente, em águas muito eutrofizadas e poluídas. Por não alcançarem os padrões de qualidade exigidos pelas entidades fiscalizadoras, muitas vezes não é possível o descarte e nem mesmo reúso de seus efluentes finais (Pearson, 1986, 1987 a,b; Mara & Pearson, 1999). Logo, para a diminuição dos riscos à saúde humana e ao meio ambiente são necessários processos de tratamento terciário, como por exemplo, sistemas microbiológicos de biorreatores com microalgas imobilizadas (Forrest, 1998; Page, 2000; Tam & Wong, 2000).

3.2.1 Polissacarídeos

O alginato é um polissacarídeo de algas. Esses polímeros são de alto peso molecular resultantes da condensação de um grande número de moléculas de aldoses e cetoses. Cada molécula de açúcar é ligada à vizinha por intermédio de uma ligação osídica, formada pela ligação da hidroxila hemi-acetálica em C-1 com qualquer das hidroxilas da outra molécula glicídica, e com eliminação de uma molécula de água. Esses produtos têm uma ampla distribuição na natureza e são constituintes essenciais de todos os organismos vivos. Ocorrem em bactérias e fungos (dextranos e goma xantana), em algas (alginatos, carragenanos e ágar-agar) e em vegetais superiores (amido, celulose, gomas, mucilagens e pectinas). Nas últimas décadas, polissacarídeos de origem vegetal surgiram como um significativo grupo de produtos naturais bioativos, com diversas atividades biológicas relatadas

(Brunenton, 1993; Srivastava & Kulshresta, 1989).

Os polissacarídeos vegetais podem ser classificados e divididos em homogêneos ou homoglicanos, que são resultantes da condensação de um grande número de moléculas de um mesmo açúcar (amido e celulose), e heterogêneos ou heteroglicanos quando formados pela condensação de açúcares diferentes (gomas, mucilagens e pectinas). Os produtos resultantes dessas condensações são macromoléculas lineares ou ramificadas, esses açúcares podem ser classificados ainda pela solubilidade em água (Brunenton, 1993).

Os ácidos algínico e alginatos são polissacarídeos de algas (ficocolóide) obtidos, principalmente, da espécie *Fucus visiculosus*. O ácido algínico é um polímero linear constituído por dois tipos de ácidos urônicos: os ácidos manurônico e gulurônico, unidos através de ligação beta. O ácido algínico é insolúvel em água, possui caráter aniônico acentuado que permite a formação de sais solúveis de sódio, potássio, amônio e insolúveis de cálcio. O ácido algínico e os alginatos formam géis viscosos, que atuam como protetores da mucosa gástrica, sendo recomendado ao tratamento sintomático de problemas de refluxo gástrico-exofágico, hérnias de hiato e exofagites. Alguns alginatos são empregados como adjuvantes em regimes hipocalóricos e como anti-hemorrágicos de uso externo, pois formam géis fibrilares, que provocam rápida homeostase. Atuam, também, como espessantes e estabilizantes em produtos farmacêuticos e alimentícios (Brunenton, 1993).

3.3 COLIFORMES FECAIS

Ingram (1977) definiu, para o monitoramento microbiológico de águas, o termo marcador biológico ou indicador microbiológico de patógenos (IMP), como sendo um organismo que, estando presente numa amostra, indica a presença de um patógeno similar ecologicamente. Logo a presença deste organismo marcador indica um potencial risco à saúde USEPA (1999).

A *Escherichia coli* é atualmente o melhor indicador biológico de contaminação fecal da água de consumo humano e indica uma ameaça direta a saúde pública (Elberg *et al.*,

2000). Baudisova (1997) demonstrou que *E. coli* é mais estável em rios que outros coliformes. Davis-Colley *et al.* (1997) também mostraram que, para sistemas de fluxo não contínuo, a *E. coli* pode ser melhor indicador em lagoas de estabilização que enterococos. Avanços nas pesquisas bacteriológicas do grupo dos coliformes confirmam a sua eficiência como marcadores microbiológicos de segurança hídrica e os estudos dos seus habitats dividem o grupo em três subgrupos:

- Termotróficos e fecais verdadeiros (*E. coli*);
- Termotróficos e coliformes onipresentes, podem fazer parte da flora intestinal humana e animais de sangue quente, bem como em ambiente naturais (*Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*);
- Psicotróficos, puramente coliformes ambientais (*Rahnella aquatilis*), que se proliferam em águas poluídas e primitivas.

Segundo Leclerc *et al.* (2001) as controvérsias entre os valores de coliformes fecais (CF) ou termotolerantes como indicadores fecais, associado com a heterogeneidade dos grupos, tem sugerido a redefinição dos termos pelo seu sinônimo *E. coli*.

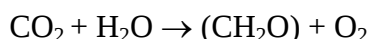
Atualmente, é de geral reconhecimento que o teste de coliformes utilizando *E. coli* aplicado em água de abastecimento tratada, não é apenas uma medida sanitária significativa, mas também um ótimo indicador da eficiência do tratamento. Este fato se dá porque bactérias coliformes, como outros indicadores bacteriológicos, são mais facilmente capturadas que inativados nos convencionais processos de tratamento, ocorrendo o contrário com os resistentes vírus entéricos e protozoários patogênicos. Logo, o uso de *E. coli* pode ser mais apropriado para indicar a presença de bactérias entéricas patogênicas. Os vírus e protozoários patogênicos devem ser analisados separadamente (Gleeson & Gray, 1997).

3.4 REMOÇÃO DE COLIFORMES FECAIS

Em vários trabalhos, o cultivo de algas tem sido utilizado e descrito na remoção de microorganismos patogênicos, através de diferentes mecanismos, demonstraram que existe

um aumento na desinfecção em lagoas de estabilização sob condições de pH elevado (Pearson, 1986; Pearson *et al.*, 1987 a; Dixo *et al.* (1995); Rangeby *et al.*, 1996; Davis-Colley *et al.*, 1997). De acordo com Curtis & Mara (1994) o cultivo de algas torna o ambiente mais alcalino (com pH acima de 8,5), propiciando uma maior formação de bicarbonato (HCO_3^-). Nestas condições, os coliformes fecais morrem rapidamente (Smallman, 1986). Estes fatos aliados às altas temperaturas do ambiente (acima de 25 °C) tornam-se a principal explicação para a redução de CF.

Inicialmente, Parhad & Rao (1974) e posteriormente, Dixo *et al.* (1995) e Rangeby *et al.* (1996) correlacionaram a alta remoção de CF ao pH básico (alcalino). O pH é elevado nas culturas de algas devido ao consumo de dióxido de carbono (CO_2) e produção de oxigênio (O_2) durante a fotossíntese:



Este balanço natural é desordenado no sistema pelo tamponamento do bicarbonato (HCO_3^-) da água:



Conforme Curtis & Mara (1994) quando o CO_2 aumenta devido à respiração das bactérias, este aumento da concentração desloca a reação para a esquerda, e apenas as oxidrilas (OH^-) são reduzidas para 2 HCO_3^- (bicarbonatos) promovendo um ambiente alcalino. Quando o pH ocorre acima de 8,5, os patógenos e coliformes fecais morrem rapidamente pois não toleram estes níveis de alcalinidade (Davies-Colley *et al.*, 1997).

Conforme Davis-Colley *et al.*, (1997) o número de coliformes fecais podem ser afetados pela luz e a luz visível azul-verde (555nm de comprimento de onda) inativa enterococos e o mecanismo de foto-oxidação é causador disto. O mecanismo de morte dos CF, por foto-oxidação, ocorre através da luz capturada por sensores dentro (endógenos) e fora (exógenos) das células. Os sensores transferem a energia destes fótons, criando formas reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) que podem inativar lipídios, proteínas e lesar o DNA e outras estruturas celulares bacterianas, como por exemplo, membranas. Estes

sensores incluem compostos moleculares com as riboflavinas, clorofila e outros.

As *E. coli* são também inativadas por UV-A, UV-B e UV-C. Entretanto, comprimentos de onda maiores são praticamente incapazes de inativar esta bactéria. A energia eletro-magnética da UV lisa o microorganismo através de danos causados durante a passagem pela membrana e parede celular, e também pela geração de compostos reativos (radicais livres) que inativam os processos celulares e danificam o material genético (DNA). As algas promovem um ambiente oxigenado que aumenta o estresse oxidativo. Outras teorias para a remoção de CF, pelas algas, incluem a rápida absorção dos nutrientes e a adesão das bactérias pela superfície das algas (Halliwell & Guttenridge, 1999).

3.5 TRATAMENTO CONVENCIONAL COM CLORO

O método convencional de tratamento hídrico com cloro (cloração) resulta em aumentos significativos nos índices de cloro residual dissolvidos nas águas de abastecimento, O tempo de contato para o tratamento hídrico é de 30min, contudo tem elevado custo anual.

As reações do cloro residual com aminas e amidas, contidas na matéria orgânica dissolvida e particulada, formam os organoclorados, que também são constituintes básicos de muitos pesticidas. Os organoclorados são compostos de carbono com cadeias alicíclicas e, alguns com anel aromático contendo cloro. As restrições quanto ao uso do cloro se devem a diversos fatores, dentre os quais: a sua elevada persistência no meio ambiente; a sua capacidade de se incorporar na cadeia alimentar; a sua ação como indutor enzimático e, principalmente, por comprovada ação carcinogênica (Suassuna, 2001).

Os danos celulares causados pelos organoclorados resultantes do tratamento hídrico convencional são gerados, principalmente, devido ao aumento do estresse oxidativo. Esses danos oxidativos lesam diversas biomoléculas (DNA, proteínas e lipídios), e são responsáveis por doenças gastro-intestinais e degenerativas (Halliwell & Guttenridge, 1999). O termo estresse oxidativo é muito usado na literatura de radicais livres e refere-se a situações de um sério desbalanço entre a produção de ROS e RNS (espécies reativas de oxigênio e nitrogênio)

e a produção de defesas antioxidantes celulares. Os principais efeitos do estresse oxidativo são a diminuição ou alteração nas enzimas de defesa antioxidante (superóxido desmutases; glutathione peroxidase) e aumento significativo de ROS e RNS. As lesões causadas no DNA, em consequência da elevação dos radicais livres, são mecanismos potencialmente pré-mutagênicos e podem contribuir para a carcinogênese. As cloronitrosaminas são espécies reativas de nitrogênio (RNS) e tem ação danificadora comprovada (Halliwell & Guttenridge, 1999; Komulainen, 2004; Buschini *et al.* 2004).

As concentrações de organoclorados em mulheres contaminadas, e não expostas ocasionalmente e seus recém nascidos, são avaliadas como fator de risco de parto prematuro, provavelmente pela ação estrogênica de alguns organoclorados, aos quais a população está exposta principalmente pela cadeia alimentar. Estudos epidemiológicos demonstraram associação entre os níveis desses compostos com baixo peso ao nascer, diminuição da duração da lactação e prematuridade (Suassuna, 2001).

3.5.1 Cloração

A cloração é usada no tratamento de águas e esgotos para efetuar a desinfecção com objetivo de destruir organismos patogênicos, controlar os microrganismos, retirar os agentes causadores de odor e sabor, eliminar o nitrogênio amoniacal e remover ferro e manganês por oxidação.

Geralmente, nas desinfecções convencionais com este halogênio é utilizado cloro residual combinado (hipoclorito de sódio ou dióxido de cloro) para garantir menor quantidade de cloro livre. Porém, sempre ocorre a formação de subprodutos de desinfecção (SPD), com predomínio de trihalometanos (THM) e ácido haloacéticos, que aumentam com a elevação dos teores de matéria orgânica dissolvida. A quantidade total de organoclorados é igual aos halogênicos orgânico total (TOX) e representa efeitos adversos à saúde (EPA, 2001).

Os derivados clorados são adicionados à água, e sua reação de oxidação da matéria

orgânica recebe o nome de “demanda de cloro”. Demanda de cloro é a diferença entre o cloro aplicado e a quantidade de cloro livre, combinado ou total remanescente no final do período de contato. O derivado de cloro reage com a amônia, formando as cloraminas, que são denominadas de “cloro residual combinado”. Após a formação das cloraminas, tem-se a presença do chamado “cloro livre”, que é constituído do ácido hipocloroso e do íon hipoclorito. Contudo, a desinfecção usando cloro nos efluentes contendo amônia é menos agressiva, pois ocorre menor formação de subprodutos de desinfecção (SPD).

3.5.2 Métodos de Aplicação de Cloro

1 – Cloração simples:

Neste método não existe a preocupação de satisfazer a demanda, simplesmente aplica-se o derivado clorado, de forma que ao fim de determinado tempo de contato o cloro residual esteja entre 0,1 e 0,2 mg/L-1, que é suficiente para garantia da qualidade microbiológica da água.

2 –Cloração com amônia

Corresponde à adição de amônia e do derivado clorado simultaneamente. É o processo utilizado em águas que contêm matéria orgânica na forma de fenóis, evitando a formação dos chamados clorofenóis, que são responsáveis pelos odores e sabores. A relação deve ser de 1:1.

3 – Cloração ao “break-point”

Ocorre sob condições controladas, adicionando cloro até que a demanda seja satisfeita. O cloro continua a ser adicionado até que os compostos cloro-nitrogenados (cloraminas), também sejam oxidados, pois estes compostos são os responsáveis por sabor e odor característicos dos derivados clorados, bem do câncer. A cloração *break point*, ocorre quando a cloração da água chega ao ponto em que a amônia é convertida a tricloroaminas ou

oxidada a nitrogênio ou outros gases.

Tabela 3.1 – Dosagem de cloro para diferentes tipos de efluentes. *

Tipo de Efluente Doméstico	Dosagem (mg/L)
Esgoto Bruto	6 a 15
Esgoto Bruto Séptico	12 a 30
Efluente Decantado	8 a 20
Efluente de Precipitação Química	3 a 10
Efluente de Filtração Biológica	3 a 15
Efluente de Processos de Lodo Ativado	2 a 8
Efluente Secundário Filtrado	1 a 6

NOTA: * Valores típicos, adaptados de WEF (1996).

3.6 TRATAMENTO COM IRRADIAÇÃO ULTRAVIOLETA (UV)

Os meios de desinfecção mundialmente utilizados são cloro, luz ultravioleta e ozônio. As várias formas de desinfecção com cloro e derivados são as mais utilizadas atualmente. Entretanto, a irradiação com ultravioleta tem avançado fortemente como meio de desinfecção.

A luz ultravioleta faz parte do espectro eletromagnético com comprimentos de onda entre 100 e 400 nanômetros (nm). Quanto menor o comprimento de onda, maior a energia produzida. As lâmpadas mais usadas de baixa pressão de vapor de mercúrio têm comprimento de onda de 253.7 nm. Portanto, a faixa do UV-C é a mais apropriada para a eliminação de micróbios. A faixa de UV vácuo (UV-V), especificamente com comprimento de onda de 185 nm, é própria para a produção de ozônio (O₃).

As lâmpadas de ultravioleta e fluorescente são similares. A luz ultravioleta é produzida como resultado de fluxo de corrente através do vapor de mercúrio entre os eletrodos da lâmpada. As lâmpadas de baixa pressão de mercúrio produzem a maioria dos raios com comprimento de 253,7 nm. Esse comprimento é muito próximo do comprimento de 260 a 265 nm, que é o mais eficiente para matar micróbios. A principal diferença entre a

lâmpada germicida e a fluorescente é que a germicida é construída com quartzo, ao passo que a fluorescente é com vidro, com camada interna de fósforo que converte a luz UV para luz visível. Colisões entre elétrons e átomos de mercúrio provocam emissões de radiação ultravioleta, que não é visível ao olho humano. Quando esses raios colidem com o fósforo, eles “fluorescem” e se convertem em luz visível. O tubo de quartzo transmite 93% dos raios UV da lâmpada ao passo que o vidro (vidro macio) emite muito pouco.

3.6.1 Desinfecção e Esterilização com UV

Os microorganismos são inativados pela luz UV principalmente como resultado de um dano fotoquímico ao ácido nucléico. A alta energia associada ao pequeno comprimento de onda (240 – 280 nm) é absorvida pelo RNA e pelo DNA das células. A máxima absorção da luz ultravioleta pelo DNA ocorre com um comprimento de onda de 260 nm (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Esterilização é quando se dá total eliminação de patógenos abaixo de um nível de medição especificado. A esterilização é definida como uma redução de contaminantes igual ou superior a 99,999999% (8 logs). A desinfecção é a redução na concentração de patógenos para níveis não infecciosos. A desinfecção atinge vários níveis de redução de patógenos (90 a 99,999%).

3.6.2 Parâmetros de Qualidade da Água para Tratamento com UV

Para efetuar a desinfecção de água potável e industrial são necessárias certas condições para a água:

1) Filtro de partículas de 5 micra, pois vírus ou bactérias podem deixar de ser atingidos quando houver partículas; 2) Dependendo da qualidade da água, filtros de carvão poderão ser necessários para retirada de material orgânico, que interfere na transmissão da luz ultravioleta 3) Deve-se reduzir níveis de ferro e de manganês para 0,3 partes por milhões (ppm) e 0,05 ppm, respectivamente, e dureza abaixo de 100 ppm. O Ferro, o manganês e a dureza (cálcio e magnésio) podem precipitar-se no tubo de quartzo prejudicando a transmissão da luz. Como filtros de carvão e resinas podem agir como aceleradores de

multiplicação de bactérias, os reatores de ultravioleta devem ser instalados no final da linha, ou seja, após esses.

Os principais fatores que afetam a desinfecção eficaz com UV são a qualidade da água, a transmissão da irradiação UV, os sólidos suspensos, o nível de orgânicos dissolvidos, a dureza total, as condições da lâmpada, a limpeza do tubo de quartzo, o tempo de uso da lâmpada, o tratamento da água antes da aplicação da UV, a vazão e o projeto do reator. Esses fatores estão relacionados principalmente com a exposição dos contaminantes na água e a transmissão eficiente de UV para uma ativação adequada. Os problemas incluem o sombreamento (em que os contaminantes pequenos são ofuscados por outros contaminantes presentes na água), incrustação ou descoloração do tubo de quartzo, intensidade da lâmpada e fluxos inadequados.

3.6.3 Transmissão da Irradiação UV

A transmissão de UV é definida como porcentagem da luz UV com comprimento de 254 nm não absorvida após passar através de uma espessura de água de 1 cm. A transmissão depende de materiais dissolvidos e suspensos na água. As transmissões reduzidas diminuem a intensidade da luz na água, requerendo, portanto, maior tempo de exposição a fim de que a água receba uma dose apropriada de irradiação.

A claridade visual da água não é um bom indicador de sua transmissão, uma vez que a água que é clara para luz visível pode absorver o comprimento de onda da luz ultravioleta. A melhor forma de medir a transmissão de luz ultravioleta na água é fazer a medição com uma pequena amostra em um aparelho chamado espectrofotômetro, que mede especificamente a transmissão do comprimento de onda de 254 nm na água. O espectrofotômetro informa o resultado em termos de porcentagem.

3.6.4 Projetos de Desinfecção com UV

A câmara de água ou reator deve ser projetada de tal forma que assegure que todos micróbios recebam uma dose suficiente de exposição à luz ultravioleta. Quando não projetados visando a esse padrão, alguns raios ultravioletas sofrem o que se chama “curto-circuito”, ou seja, micróbios passam pela câmara sem receber dose suficiente de luz

ultravioleta. Atualmente essas câmaras são projetadas da mesma forma que aviões e carros, ou seja, testadas em túneis com fluxo de ar. No caso de reatores, no projeto utilizam-se os sistemas CFD (computacional fluid dynamics - dinâmica de fluido computacional), ou seja, programas que mostram como se processa o fluxo de água através da câmara, mostrando inclusive a trajetória de partículas, para se otimizar o projeto. Sem dúvida o teste final com análises de água antes e após o ultravioleta, variando-se vazão, quantidade de contaminação antes e após o ultravioleta, é que garantirá a indicação final do produto.

Basicamente, existem dois tipos de lâmpadas que são utilizados em projetos de desinfecção com ultravioleta.

- 1) Baixa pressão de mercúrio;
- 2) Média pressão de mercúrio.

Atualmente uma nova versão de lâmpadas com baixa pressão de mercúrio está sendo utilizada, as lâmpadas de baixa pressão e grande potência (LPHO*). A vantagem é na redução do número de lâmpadas, aumentando a potência do sistema e diminuindo os custos. A grande vantagem do uso de ultravioleta em efluentes é que nada é acrescentado à mesma, ou seja, quando o efluente é despejado em um corpo aquático, a água está praticamente isenta ou de acordo com os limites de microorganismos e sem subprodutos nocivos ao meio ambiente

3.6.5 Outras Aplicações de Irradiação UV

1) **Quebra de ozônio:** O ultravioleta com dosagem apropriada transforma o ozônio em oxigênio: $2O_3 + UV^{254} = 3O_2$;

2) **Uso de UV para descloração:** Dosagens elevadas de ultravioleta, utilizando-se lâmpadas de média pressão, reduzem os níveis de cloro na água. Essa solução é utilizada quando não se deseja o uso de filtros de carvão ativado ou metabissulfito de sódio;

3) **Processos de oxidação avançada para efluentes:** Redução de COT (Carbono Orgânico Total) é outra importante aplicação da irradiação ultravioleta, sendo que é utilizado em processos de oxidação avançada, utilizando-se, por exemplo, UV + H₂O₂ (peróxido de hidrogênio), UV + O₃ (ozônio) e UV + TiO₂ (dióxido de titânio). Esses processos são utilizados para a oxidação de efluentes de indústrias químicas, farmacêuticas ou cosméticas e

ocorre principalmente através da produção da espécie reativa de oxigênio hidroxila (radical livre $\text{OH}^\bullet$) que quebra cadeias complexas dos contaminantes, transformando-os em subprodutos mais simples, ou mesmo em $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ (WEF, 1996 e Gonçalves, 2003).

O sistema de desinfecção com irradiação ultravioleta (UV) é uma técnica eficiente de tratamento hídrico, contudo tem custo elevado e requer afluentes com qualidade bem definida e restrita. Desta forma, o sistema biológico com microalgas imobilizadas demonstra ser mais adequado para o tratamento de esgotos e águas residuais em regiões de clima quente.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MANUTENÇÃO DA CULTURA

As cepas de *Chlorella* sp. isoladas do solo, em trabalhos anteriores (Sian, 1984; Megharaj *et al.*, 1992), foram isoladas dos efluentes das lagoas de estabilização da ETE de Ponta Negra-Natal/RN, cultivadas em frascos Erlenmeyer de 2L com 500mL de meio basal Bold's (Bischoff & Bold, 1963; Borowitzka, 1988). Os frascos com 500mL deste meio basal (anexo) foram inoculados com 10mL de microalgas na fase estacionária, abaixo de lâmpadas fluorescentes brancas de 40W e com intensidade de fótons de aproximadamente $85\mu\text{E}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ou com luz solar por 3h e incidência de aproximadamente $0,9\text{ kcal}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$, a temperatura ambiente média foi de $28^{\circ}\text{C} \pm 3$.

Os frascos de cultivo foram agitados manualmente a cada 8h. As culturas utilizadas nos experimentos tinham 90 dias de cultivo, que garantiu a eficiente concentração de células do experimento (Figuras 4.1 a 4.4). Quinzenalmente durante o período de cultivo as células das microalgas eram isoladas e ressuspensas em 500mL de meio basal Bold's.

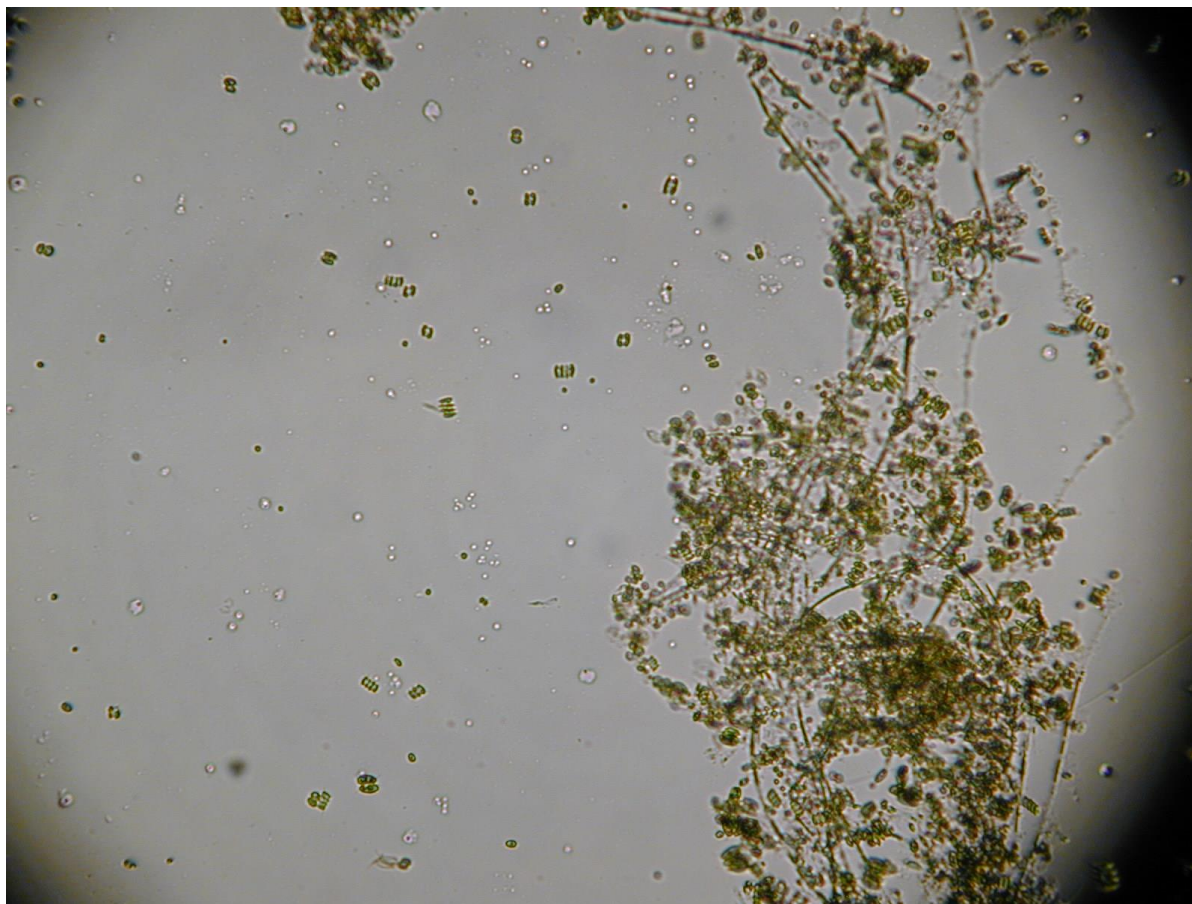


Figura 4.1 - Fotografia digital (Nikon coolpix E-950) em microscópio óptico (Nikon eclipse E-200) das microalgas (*Chlorella*) cultivadas após 90 dias. (A=100X)

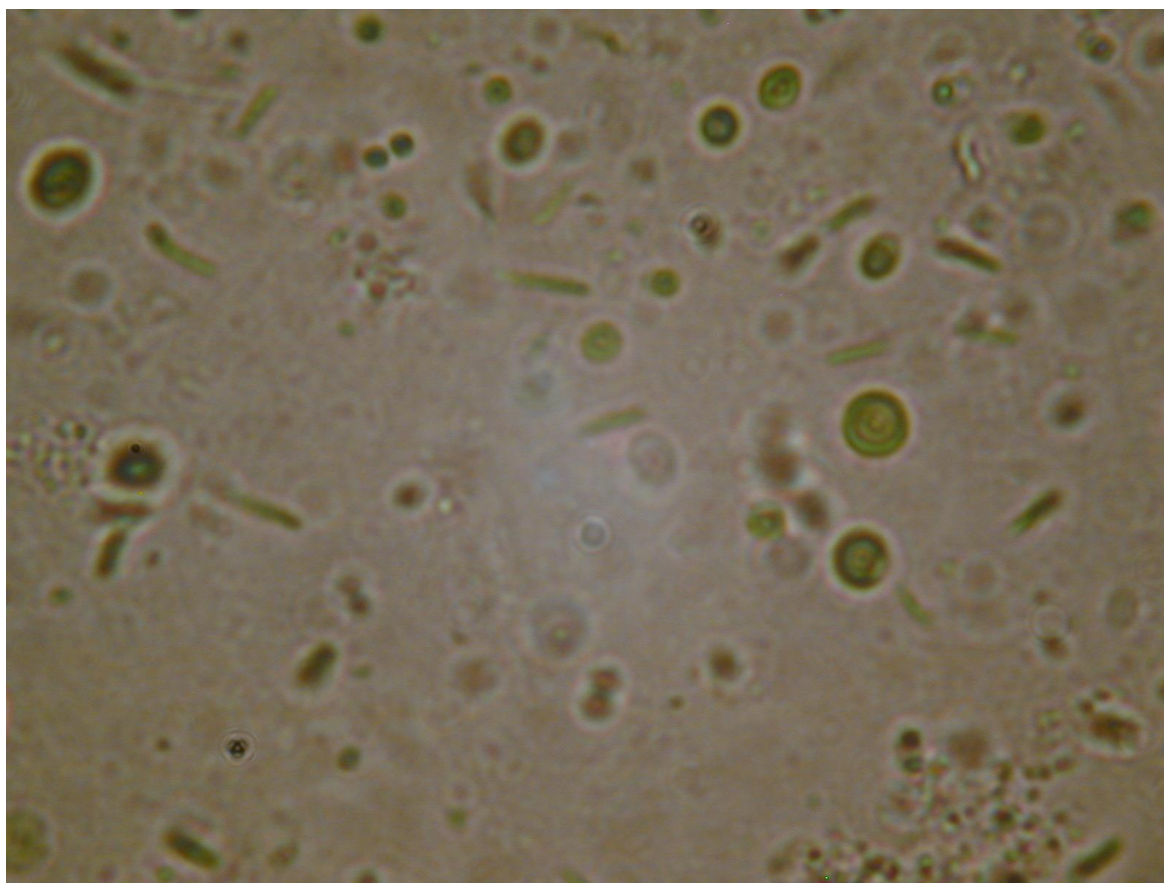


Figura 4.2 - Fotografia digital (Nikon coolpix E-950) em microscópio óptico (Nikon eclipse E-200) com microalgas-verdes (*Chlorella*). (A=400X)

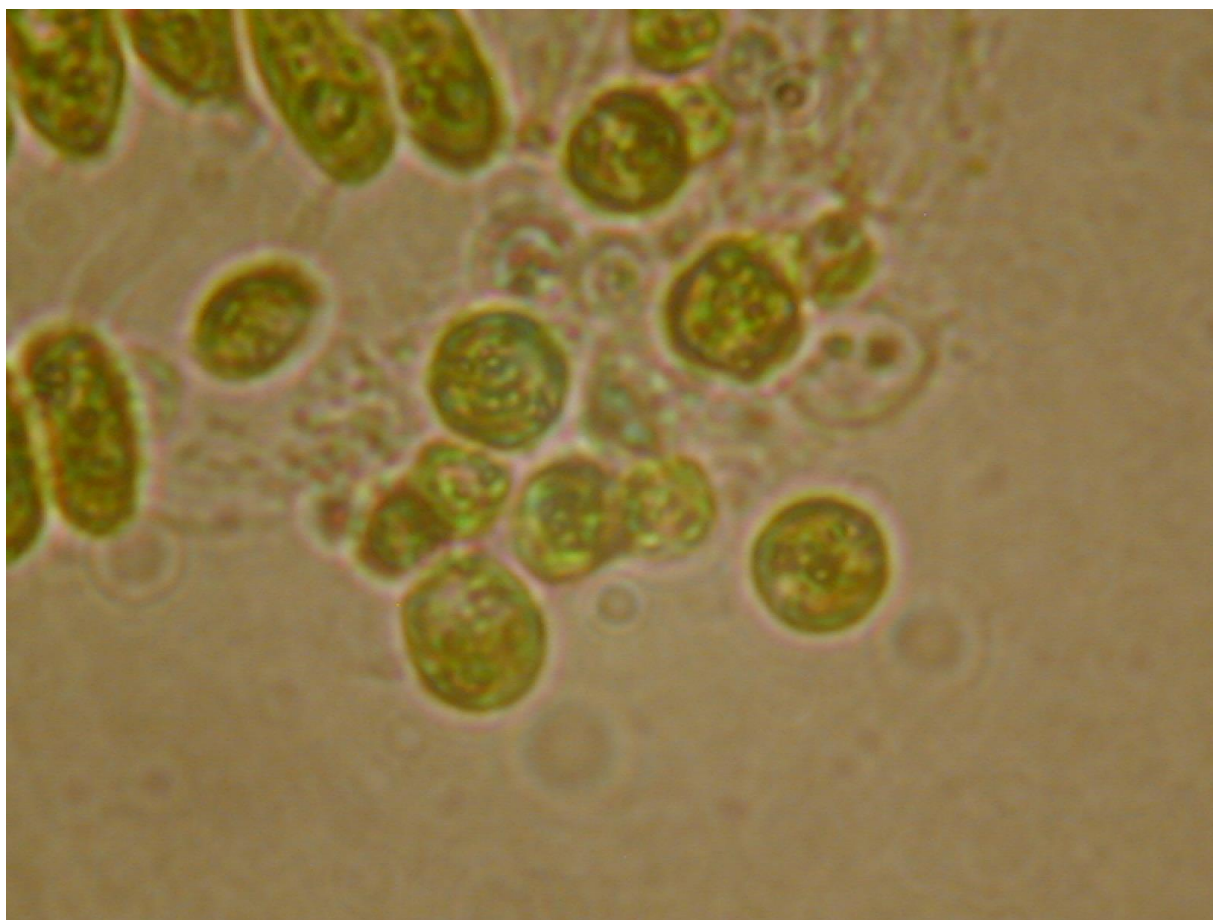


Figura 4.3 - Fotografia digital (Nikon coolpix E-950) em microscópio óptico (Nikon eclipse E-200) com microalgas do gênero *Chlorella*. (A=1000X)

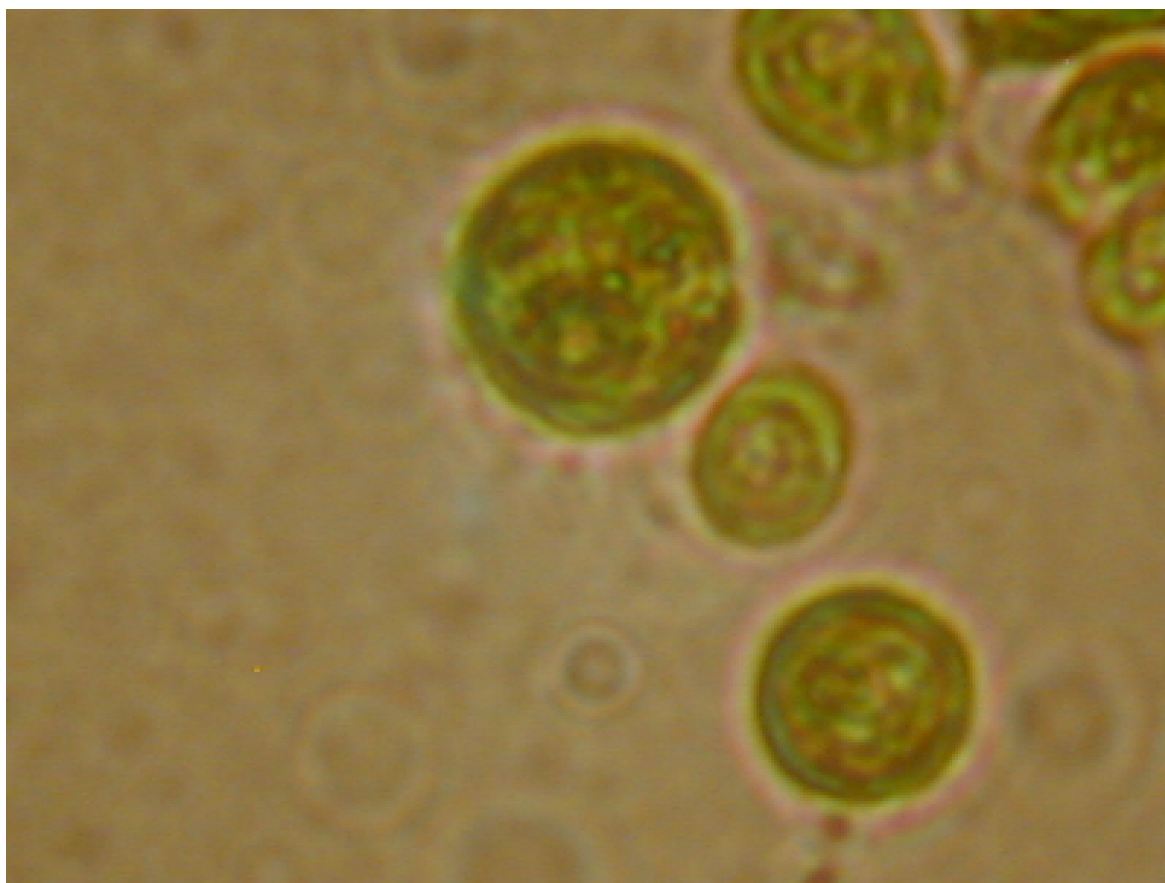


Figura 4.4 - Fotografia digital (Nikon coolpix E-950) em microscópio óptico (Nikon eclipse E-200) com microalgas (*Chlorella*). (A=2500X)

4.2 IMOBILIZAÇÃO CELULAR

As células das microalgas (*Chlorella* sp.) após o cultivo foram centrifugadas à 3000g por 10min, lavadas e ressuspendidas na concentração de 7×10^7 células/mL em água destilada com pH neutro ajustado. A suspensão algal foi misturada com roto-misturador em 4% de alginato de sódio autoclavado, numa proporção de volume de 1:1 para produzir uma mistura de 2% de alga-alginato em suspensão.

Posteriormente esta mistura foi vertida através de balão volumétrico numa solução de 0.4M de CaCl_2 , que esteve sujeita a constante agitação, para a formação dos beads (esferas) da matriz (Figuras 4.5 a e b). As matrizes de alginato de cálcio possuíam esferas (“beads”) com diâmetro médio de 4mm e nos biorreatores a concentração de estoque de microalgas foi de 10^6 células/beads (Figura 4.6).

O volume da matriz de alginato foi de 22cm^3 que continham aproximadamente

400 esferas (“beads”) formadas, correspondendo a cada 65mL da mistura alga-alginato. O reator controle (branco) construído e preparado da mesma forma que os biorreatores (*Chlorella*), porém sem algas (Megharaj *et al.*, 1992; Forrest, 1998; Page, 2000; Tam & Wong, 2000).



Figura 4.5 - Fotografias digitais (Nikon coolpix E-950) dos “beads” (esferas) de alginato de cálcio com microalgas (*Chlorella*) immobilizadas (a) e sem algas (b). Escala milimétrica.

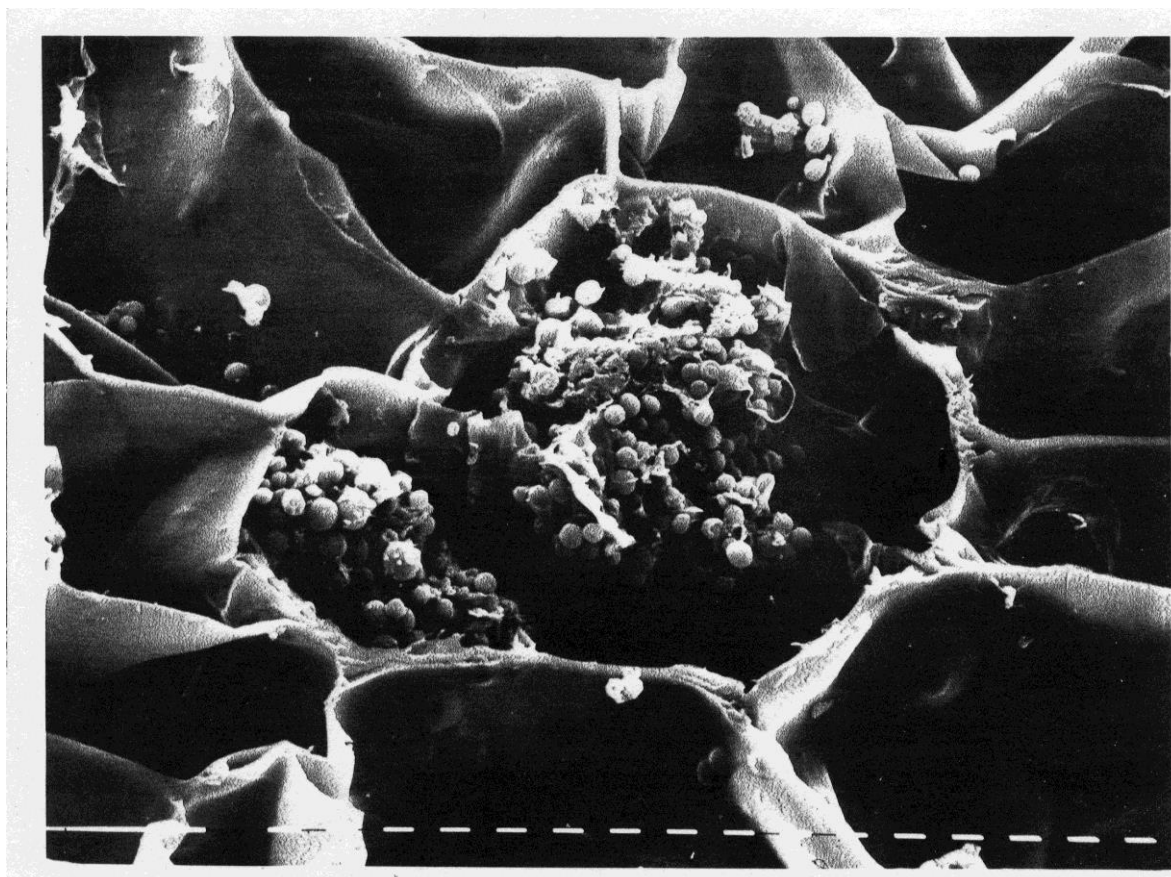


Figura 4.6 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da estrutura interna do “bead” da matriz de alginato de sódio com microalgas do gênero *Chlorella* imobilizadas (Sian, 1984).

4.3 DESCRIÇÃO DO BIORREATOR E DO EXPERIMENTO

Os reatores (colunas) de fluxo gravitacional foram construídos com buretas de vidro de transparente de 50mL (60cm de comprimento, 0,5cm de diâmetro externo, 3mm de espessura) e o sistema de tratamento foi por batelada (Figuras 4.7 e 4.8). A capacidade de retenção média dos reatores foi de 10mL de afluente contaminado. As colunas, antes da fixação das matrizes, foram esterilizadas na superfície com etanol 70%, lavadas internamente com água destilada e posteriormente, conectada aos recipientes com o efluente contaminado com CF na concentração média de 10^{11} células/(100mL).

A concentração dos nutrientes fornecidos para cultivo e imobilização celular esteve dentro dos níveis médios contidos em águas residuais resultantes de tratamento secundários. As colunas sob irradiação artificial foram mantidas a $28^{\circ}\text{C} \pm 3$, com uma

densidade de fluxo de fótons contínuo de aproximadamente $85\mu\text{E} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, por 24h e provido por uma lâmpada branca fluorescente de 40W, distante de 15cm. As colunas sob irradiação solar de 6h (11:00 às 17:00) e com sombrite de 25% (aprox. $1,0 \text{ kcal} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$) foram mantidas com temperatura ambiente de $30^{\circ}\text{C} \pm 3,5$. As amostras dos efluentes tratados nas colunas sob luz artificial e solar foram coletadas para a análise da concentração de CF (UFC/100mL) com intervalos de 1 a 3 dias e após os tempos de contato respectivos nas matrizes de 0,05h, 3h, 6h, 9h, 12h e 24 h e 0,05h, 0,5h, 1h, 3h, 6h. Na ausência de luz foram realizados dois experimentos com tempo de contato de 12h.

Todos os tratamentos biológicos realizados através dos biorreatores com as microalgas imobilizadas, do gênero *Chlorella*, continham matrizes com concentração média de $3,7\mu\text{g}$ de clorofila “a”. bead^{-1} . Ambas colunas (*Chlorella* e controle) possuíam aproximadamente $4,4 \times 10^2$ beads fixados num volume total aproximado de 22cm^3 de matriz (Fig. 4.8 e 4.9). Durante todo o período de análise, a capacidade média de retenção das colunas foi de aproximadamente 10mL de afluente contaminado ($44 \text{ beads} \cdot \text{mL}^{-1}$ efluente).

Os afluentes contaminados em laboratório por coliformes fecais (CF) foram submetidos a tratamento biológico terciário em coluna (biorreator) contendo microalgas do gênero *Chlorella* sp. imobilizadas em matriz de alginato de cálcio. O controle desse biorreator foi construído numa coluna idêntica, porém, composta apenas por matriz de alginato de cálcio sem algas. As colunas com e sem algas denominadas, respectivamente, de “*Chlorella* e controle” foram submetidas a duas condições de tratamento (tabela 5.1):

1- Sob **irradiação artificial** (luz elétrica) constata por 24h (aprox. $85\mu\text{E} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$), no período de 21/11/2004 a 25/01/2005, inicialmente, foram realizados seis experimentos laboratoriais com as microalgas imobilizadas na matriz do biorreator entre 10 e 40 dias.

Posteriormente, dois outros experimentos foram realizados utilizando o mesmo biorreator, com o intuito de testar a viabilidade e durabilidade das microalgas após um período de, aproximadamente, dois meses (63 dias) de imobilização na matriz. Durante todas as análises de CF as colunas receberam irradiação constante por 24h através da fonte artificial de fótons (luz elétrica) distante 15cm dos reatores. Os tempos de contato do afluente contaminado por CF com essas matrizes foram de 0,05h, 3h, 6h, 9h, 12h e 24h. A temperatura do ambiente e dos efluentes tratados variou, respectivamente, entre $27,5$ e $30,5^{\circ}\text{C}$ e $28,0$ e $29,5^{\circ}\text{C}$.

2- Sob **irradiação solar** foram realizados seis experimentos no período de 27/01 a 25/02/2005, nos quais a luz natural incidiu através do sombrite por 6h nas colunas, no horário das 11:00 às 17:00. A incidência solar na região durante estes meses variou entre 0,8 e 1,2 kcal.cm⁻².d⁻¹. O sombrite foi de 25%, e esta proteção impediu que a temperatura ultrapassasse os 37°C. Para essa condição de tratamento foram geradas colunas idênticas às anteriores, com a mesma concentração de matriz e de microalgas (10 dias de imobilização). Os tempos de contato dos afluentes tratados com as matrizes foram de 0,05h, 0,5h, 1h, 3h, 6h. A temperatura ambiente oscilou entre 27,0 e 34,5°C e dos efluentes tratados variou entre 30,5 e 33,5°C.

Posteriormente, dois experimentos com estes reatores foram realizados, porém na ausência de fonte de fótons (escuro), com tempo de contato de 12h (período noturno), que iniciaram às 18:00 do dia anterior e terminaram às 6:00 do dia posterior. A temperatura do ambiente oscilou entre 27,5 e 29,0°C e dos efluentes entre 28,5 e 30,0°C.

Tabela 5.1 - Detalhes dos experimentos (n) sob luz artificial, solar e na ausência de fótons (n=16).

	Experimento (n)	Tempo de contato do efluente na coluna (h)	Variação da temperatura ambiente (°C)
Irradiação Artificial	1	0.05; 3; 6; 9; 12; 24	27,5 a 30,5
	2		
	3		
	4		
	5		
	6		
	7		
	8		
Irradiação Solar	9	0.05; 0,5; 1; 3; 6;	28,0 a 34,5
	10		
	11		
	12		
	13		
	14		
Escuro	15	12	27,5 e 29,0
	16		

Os afluentes contaminados (10¹¹ UFC/100mL) foram vertidos por gravidade nas colunas à 25°C (*Chlorella* e controle) e após os determinados tempos de contato 10mL de efluentes tratados foram coletados para análise em triplicata da concentração de coliformes

fecais (CF). O sistema de batelada foi utilizado durante esse tratamento biológico terciário com biorreatores. A concentração dos CF foi expressa em CF/100mL e determinada pelo método de análise das membranas filtrantes de celulose (Millipore®, 0,45µm). O efluente tratado foi submetido à análise da concentração de CF logo após a coleta ou mantido refrigerado (4°C) por até 4 horas para posterior determinação bacteriológica.

Os dados obtidos durante o tratamento foram analisados estatisticamente em relação aos tempos de contato (ANOVA – fator único), através do software Microsoft Excel para $p < 0,05$, e foram expressos na escala logarítmica (UFC/100mL) para ambos reatores (*Chlorella* e controle).

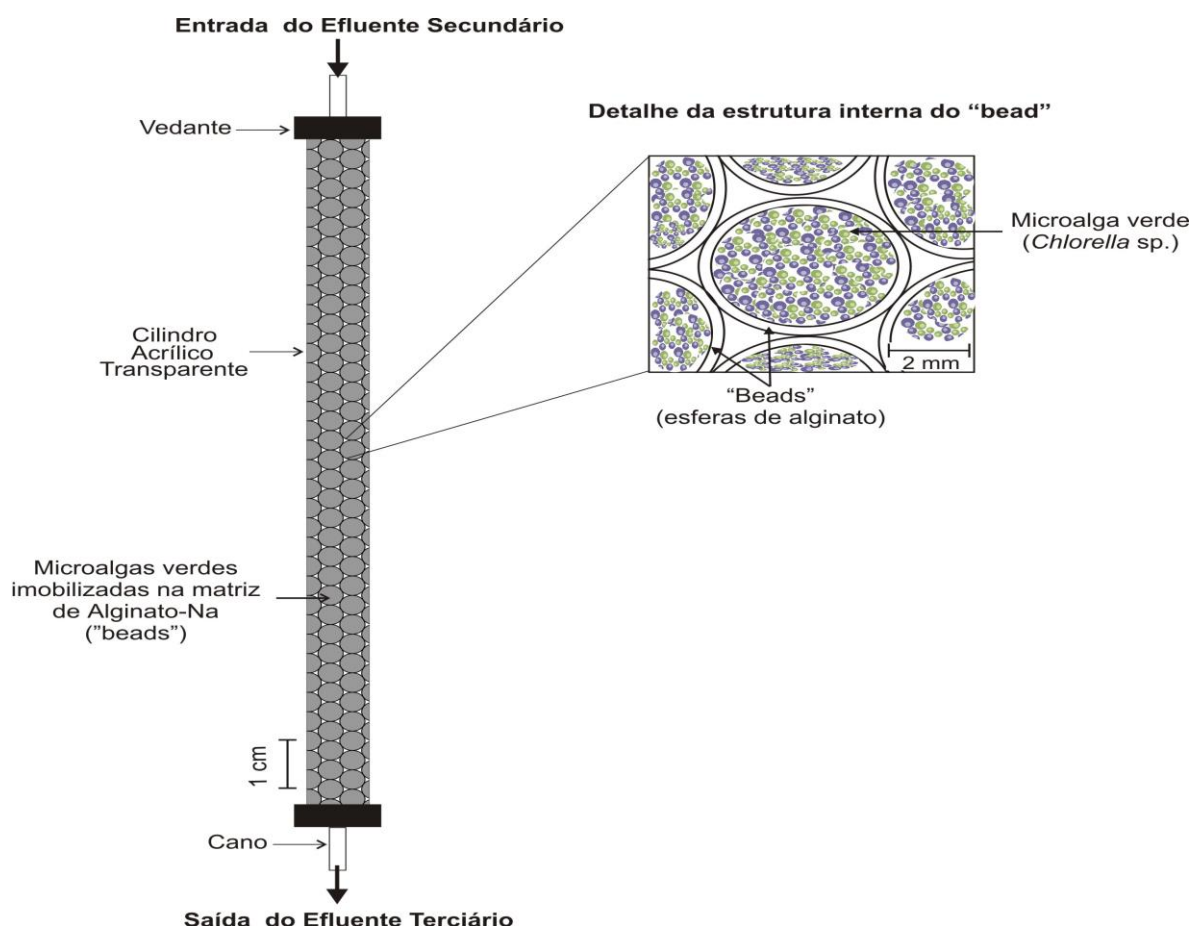


Figura 4.7 - Representação esquemática dos biorreator com detalhe das microalgas imobilizadas na estrutura dos "beads" da matriz de alginato de cálcio.



Figura 4.8 - Fotografia digital (Nikon coolpix E-950) dos reatores (*Chlorella* e controle) com microalgas imobilizadas (esquerda) e sem algas (direita).

4.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS ALGAS

A concentração de microalgas nas esferas (beads) foi avaliada pela extração de clorofila “a” com metanol, sendo que a concentração deste pigmento fotossintetizante tem

relação direta com a densidade de microalgas (Figura 4.9), conforme método descrito por Pearson (1986).

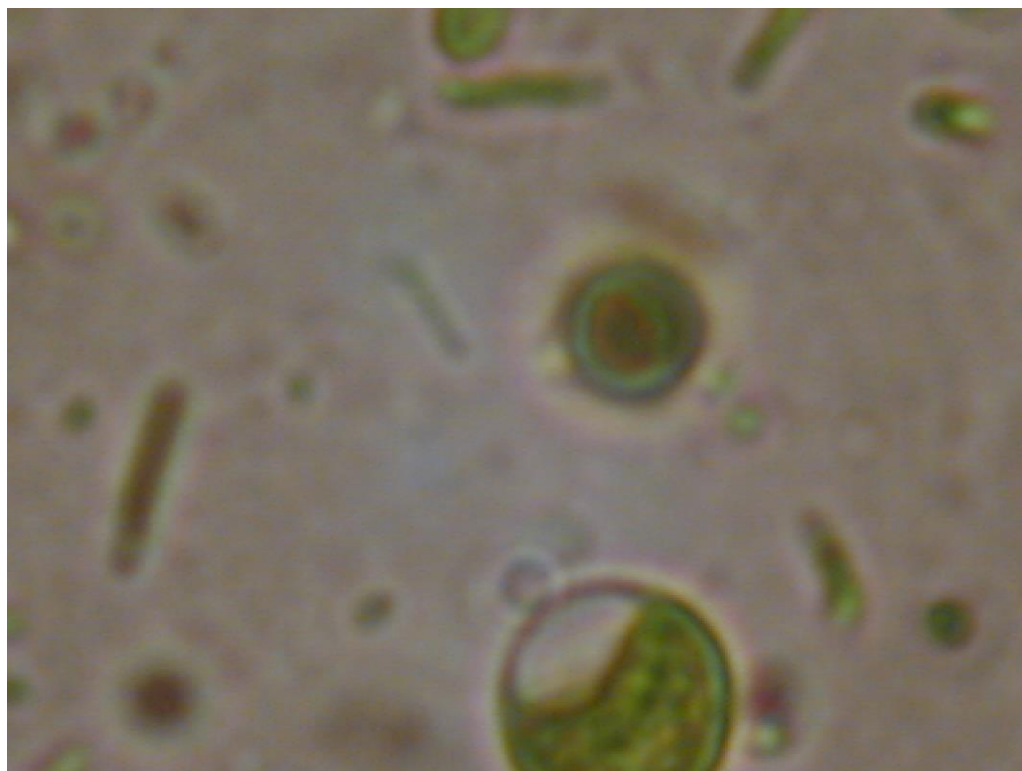


Figura 4.9: Fotografia digital (Nikon coolpix E-950) em microscópio óptico (Nikon eclipse E-200) de microalga-verde do gênero *Chlorella* com para-amido característico do gênero em forma de xícara. (A= 2500X)

4.5 DETERMINAÇÃO DA REMOÇÃO DOS COLIFORMES FECAIS

As concentrações de coliformes fecais (CF) foram determinadas pelo método de microfiltração com membranas de celulose (Millipore[®]) de 0,45µm e 47mm de diâmetro e expressa em unidades de colônias filtradas (UFC/100mL).

Os resultados foram analisados através de amostras em triplicatas de oito experimentos laboratoriais sob luz artificial e seis experimentos sob luz solar, conforme os métodos do APHA (American Public Health Association, 1995). Os valores das reduções de todos os experimentos foram expressos em triplicatas na escala logarítmica e em relação à redução dos controles, e submetidos à análise estatística ANOVA – fator único através do software Microsoft Excel (Megharaj *et al.*, 1992; Tam & Wong, 1994; Tam *et al.*, 2000; De-Bashan *et al.*, 2002).

Todos os afluentes contaminados submetidos a esses tratamentos biológicos terciários foram gerados em laboratório e continham concentração média de CF de 10^{11} UCF/100mL nos afluentes. Esses afluentes contaminados foram obtidos através da inoculação de colônias isoladas de CF em 100mL de meio seletivo líquido para CF (Difco® - sem ágar), que foram cultivados em estufa à 44°C por 24h, posteriormente, 1mL deste meio seletivo líquido, foi diluído em 100mL de água destilada com pH ajustado para 7,0, para a formação do afluente contaminado com concentração média de 10^{11} CF/100mL.

4.5.1 DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE DECAIMENTO DE COLIFORMES FECAIS (K_b)

O modelamento da razão de decaimento bacteriano é importante para estimar a concentração de coliformes no efluente de sistemas de tratamento hídrico. O decaimento de coliformes geralmente é modelado através do cálculo da constante de degradação de primeira ordem (K_b). A concentração de coliformes nos efluentes é função direta da configuração e do fluxo hidráulico do sistema. Dependendo do regime hidráulicos utilizados diferentes fórmulas podem ser empregadas para avaliar a concentração de CF no sistema. Neste estudo foi utilizado o modelo de fluxo pistão para determinar o decaimento bacteriano. Neste modelo, os valores de K_b são calculado pela equação 1 e 2:

$$N = N_o^{-K_b.t} \quad (1)$$

Isolando K_b obtêm-se:

$$K_b = -\ln\left(\frac{N}{N_o}\right)\frac{1}{t} \quad (2)$$

Onde: N é a concentração de coliformes fecais no efluente (CF/100mL); N_o é a concentração de coliformes fecais no afluente (UFC/100mL); t é o tempo de detenção hidráulica em dias (von Sperling, 1999 e Gonçalves, 2003).

A eficiência (E%) deste sistema de tratamento biológico terciário com microalgas imobilizadas foi estimada pela equação 3:

$$E = \frac{N_o - N}{N_o} \times 100 \quad (3)$$

Pearson *et al.* (1987-a) analisando em laboratório os efeitos da temperatura sobre o decaimento de CF a pH=9, concluíram que aumenta o decaimento em esgotos brutos e efluentes de lagoas de maturação com o aumento da temperatura dos efluentes. Porém, outros experimentos laboratoriais com pH=7,6 decaimentos significativos ocorrem apenas com temperaturas de 35⁰C. Os autores indicam que os valores de pH>9 representam papel crucial no aumento do decaimento e que o valor Kb é dependente da temperatura do efluente. Nas lagoas de estabilização o regime hidráulico, a concentração de algas e a temperatura têm significativa influência na remoção de CF.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

No intuito de verificar a capacidade de remoção bacteriológica realizou-se análise da concentração de CF, após o tratamento biológico no reator contendo microalgas imobilizadas.

No apêndice encontram-se as tabelas com as médias das triplicatas em escala logarítmica da concentração de CF obtida após os experimentos realizados sob luz artificial, solar e no escuro, em relação tempos de contato com as matrizes (*Chlorella* e controle), bem como, os respectivos erros padrões ($\pm$) para nível de confiança de $p < 0,05$ (ANOVA – fator único).

5.1 TRATAMENTO SOB LUZ ARTIFICIAL

As figuras 5.1 a 5.4 foram geradas a partir da análise estatística dos valores de redução da concentração de CF, observados em oito experimentos sob irradiação artificial.

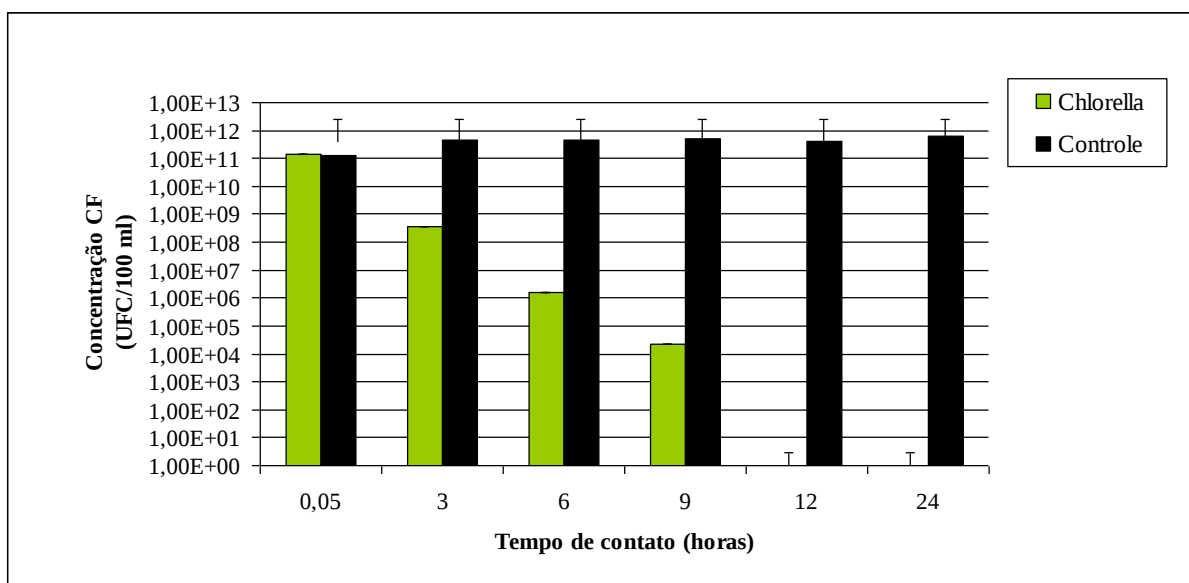


Figura 5.1 - Concentração CF (UFC/100mL) em relação aos tempos de contato (h) no biorreator (verde) com microalgas (*Chlorella*) e no controle (preto) sem algas. Os valores correspondem às médias de triplicatas de seis primeiros experimentos com luz artificial constante e com algas imobilizadas na matriz entre 10 e 40 dias. O máximo desvio padrão ($\pm$) obtido em cada coluna foi representado para $p < 0,05$.

De acordo com a figura 5.1 nos seis primeiros experimentos laboratoriais com luz artificial observou-se redução significativa na concentração bacteriológica fecal, em relação ao controle, para os tempos de contato de 3h (99%), 6h (99,99%) e 9h (99,9999%). Esses valores obtidos indicaram redução média da concentração de CF superior a 99% (2 log) a cada 3 horas de contato dos afluentes contaminados com a matriz de alginato de cálcio contendo microalgas-verdes imobilizadas e irradiadas com luz artificial por 24h. A desinfecção completa foi observada no efluente tratado, após os tempos de contato de 12 e 24h na coluna de matriz com microalgas, representando reduções superiores a 99,999999999% (11 log) em relação ao controle.

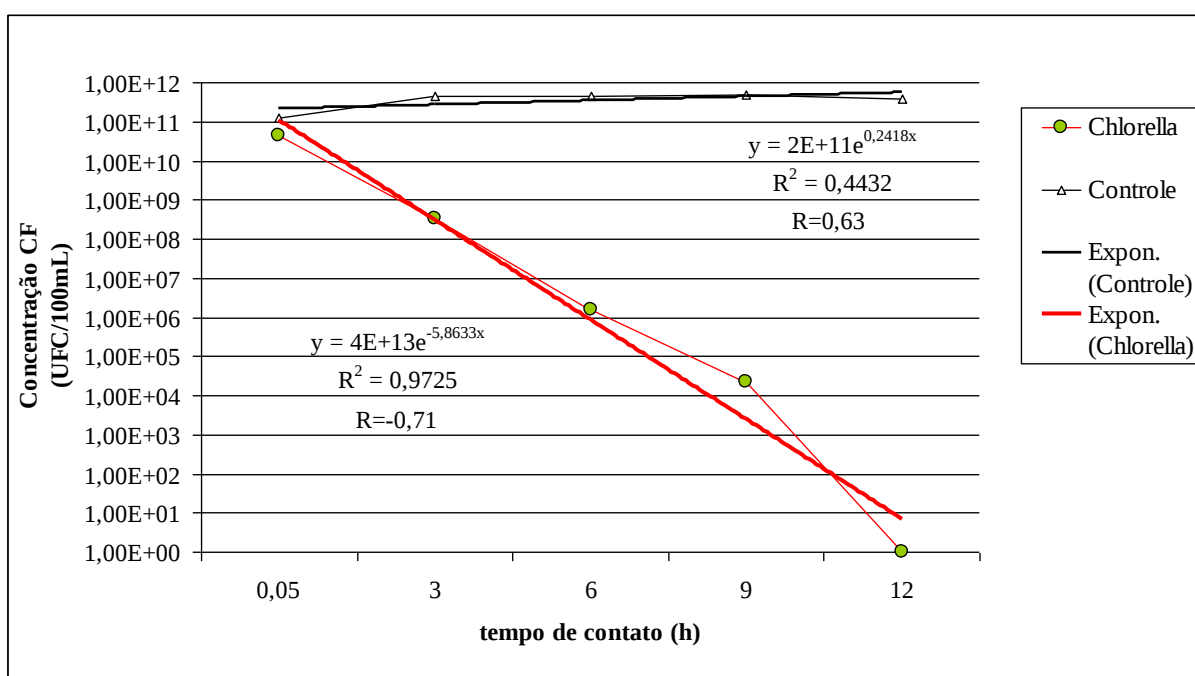


Figura 5.2 - Correlação entre a concentração de CF (UFC/100mL) após os respectivos tempos de contato (h) no biorreator (*Chlorella* sp.) e no controle (sem algas), com representação dos coeficientes correlação (R) e regressão (R^2), linhas de tendência (exponencial) e médias das triplicatas dos seis experimentos sob luz artificial constante e com algas imobilizadas na matriz entre 10 e 40 dias.

Para essa condição de tratamento terciário (luz artificial e imobilização recente) os tempos de contato de 3 minutos e todos os controles (reator sem algas) não apresentaram remoção e nem decréscimo significativo nas concentrações de CF para $p < 0,05$ (ANOVA – fator único) com o aumento do tempo de contato.

A figura 5.2 mostra a relação entre a redução da concentração de CF (UFC/100mL) e os respectivos tempos de contato nos reatores (*Chlorella* e controle), as linhas de tendência,

os coeficientes de correlação, regressão e as equações da reta para $p < 0,05$ (ANOVA – fator único). A correlação (R) entre as concentrações de CF e o tempo de contato (h) na coluna com microalgas imobilizadas foi negativa (inversamente proporcional, $R = -0,71$), com coeficiente de regressão significativo ($R^2 = 0,97$).

Esses coeficientes (R e R^2) confirmam a existência de relação entre o decréscimo das concentrações de CF e o aumento do tempo de contato (h) do afluente na coluna com microalgas irradiadas com luz elétrica por 24h (para $p < 0,05$). O reator sem algas (controle) apresentou correlação insignificante e baixa capacidade de desinfecção no período.

Após essa etapa de tratamento, ambas as colunas foram mantidas à constante irradiação artificial por 24h durante mais de 2 meses, sendo neste período, semanalmente adicionado alternadamente 10mL de Meio Basal Bold e 10mL de água destilada. Posterior a este procedimento, iniciou-se uma nova etapa de tratamento, que objetivou avaliar a capacidade de desinfecção das microalgas na matriz após longo período de imobilização. A figura 5.3 apresenta o gráfico representativo de dois experimentos laboratoriais realizados com luz artificial e microalgas imobilizadas entre 63 e 72 dias na matriz. Observa-se que houve redução significativa na concentração bacteriológica fecal, em relação ao controle, para os tempos de contato de 3h de 99,9% (3 log), 6h de 99,9999 (6 log) e 9h de 99,99999% (7 log).

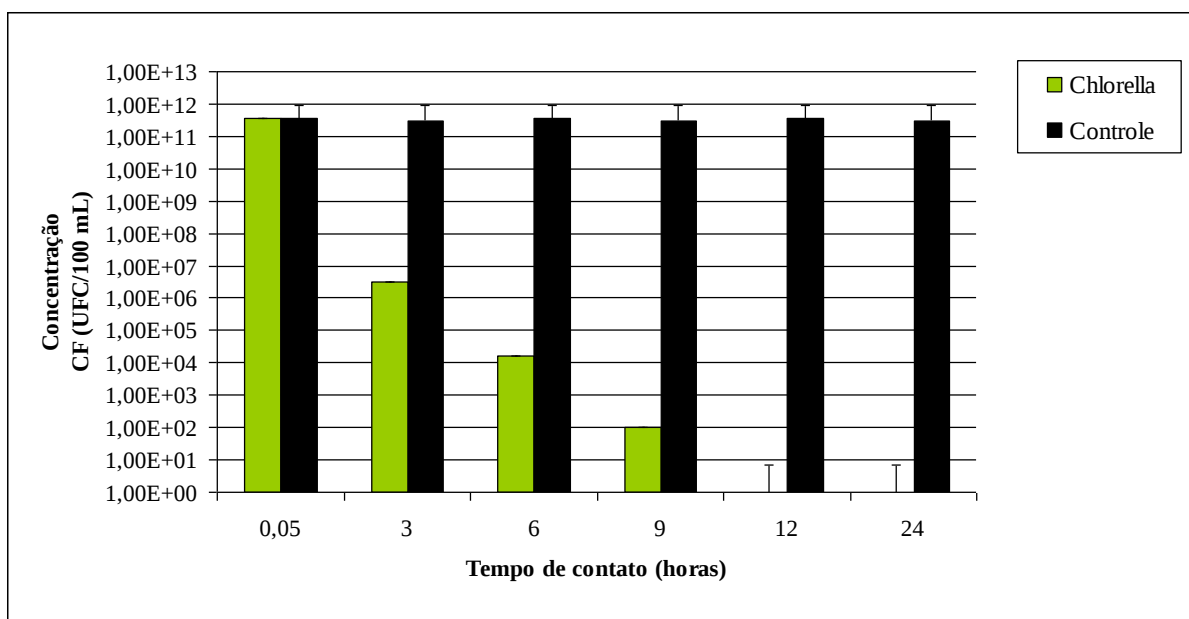


Figura 5.3 - Concentrações CF (UFC/100mL) em relação aos tempos de contato (h) no biorreator (verde) com microalgas (*Chlorella*) e no controle (preto) sem algas. Os valores correspondem às médias de triplicatas de dois experimentos com luz artificial constante por 24h e com algas imobilizadas na matriz entre 63 e 72 dias. O máximo desvio padrão ($\pm$) obtido em cada coluna foi representado para $p < 0,05$.

Esses dados obtidos indicaram redução média da concentração de CF superior a 99% (2 log) a cada 3 horas de contato dos afluentes tratados com microalgas imobilizadas após 2 meses (72 dias). O aumento observado na eficiência depurativa do sistema deve-se, provavelmente, ao aumento da concentração de microalgas-verdes (clorofila “a”) na matriz de alginato de cálcio do biorreator, níveis de pH alcalino (acima de 8), bem como, à constante e direta incidência de fótons artificial. O aumento da concentração de clorofila “a” na matriz no decorrer do tempo de imobilização, já foi observado e reportado por outros autores que utilizaram este gênero de microalgas em biorreatores semelhantes para tratamento hídrico (Forrest, 1998; Page, 2000; Tam & Wong, 2000).

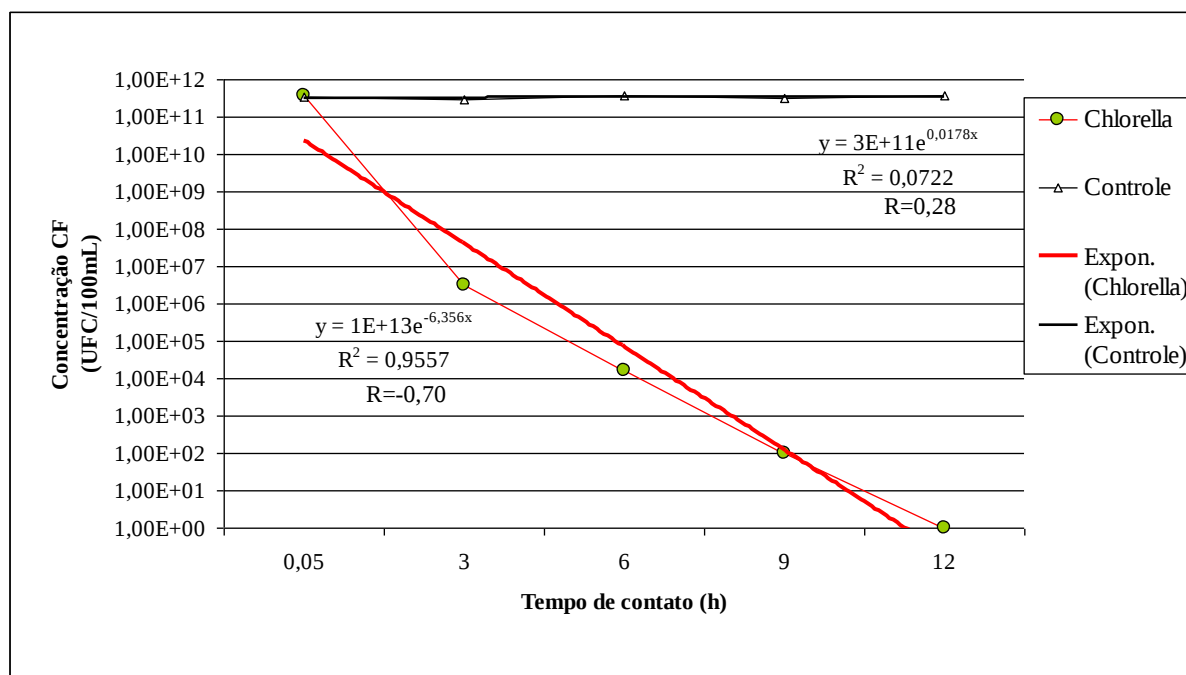


Figura 5.4 - Correlação entre a concentração de CF (UFC/100mL) e os respectivos tempos de contato (h) no biorreator (*Chlorella* sp.) e no controle (sem algas), com representação dos coeficientes correlação (R), regressão (R^2), linhas de tendência (exponencial) e médias das triplicatas de dois experimentos sob luz artificial constante e com tempo de imobilização na matriz entre 63 e 72 dias.

A desinfecção completa dos afluentes contaminados foi observada nos tempos superiores à 12h de contato na matriz com microalgas. Para os experimentos submetidos a essa condição de tratamento (após 63 dias de imobilização e luz artificial) o tempo de contato de 3min e o controle (reator sem algas) não apresentaram desinfecção e nem decréscimo significativo nas concentrações de CF para $p < 0,05$ (ANOVA – fator único) com o aumento do tempo de contato.

A figura 5.4 mostra a relação entre a redução das concentrações de CF (UFC/100mL) e os respectivos tempos de contato nos reatores (*Chlorella* e controle), as linhas de tendência, os coeficientes de correlação, regressão e as equações da reta para $p < 0,05$ (ANOVA – fator único). A correlação (R) entre as concentrações de CF e os tempos de contato (h) na coluna com microalgas imobilizadas foi negativa (inversamente proporcional, $R = -0,70$), com coeficiente de regressão significativo ($R^2 = 0,95$).

Esses coeficientes (R e R^2) confirmam a existência de relação entre o decréscimo das concentrações de CF e o aumento do tempo de contato (h) do afluente com a matriz contendo microalgas imobilizadas por 63 dias (para $p < 0,05$). O reator sem algas (controle) apresentou nestas análises, novamente, correlação insignificante entre a concentração de CF e

o aumento do tempo de contato.

Nos experimentos realizados sob luz artificial (n=8), observou-se redução significativa a partir de 3h de contato do afluyente com a matriz de microalgas imobilizadas. A desinfecção completa dos efluentes tratados no biorreator (*Chlorella* sp.) ocorreu novamente após o tempo de contato de 12 horas, onde também, observaram-se reduções superiores a 99,999999999% (11 log) em relação ao efluente tratado pelo controle (sem algas).

Comparando-se os gráficos das figuras 5.2 e 5.4, obtém-se a figura 5.5 que relaciona as duas correlações observadas nestes oito experimentos sob luz artificial. O biorreator (*Chlorella*) continuou eficiente na redução da concentração de CF nos efluentes, após dois meses (72 dias) de imobilização, em relação ao controle. Demonstrando, desta forma, que as microalgas imobilizadas têm durabilidade e viabilidade para a desinfecção de afluentes contaminados. O reator sem algas (controle) continuou não apresentando capacidade de redução de CF.

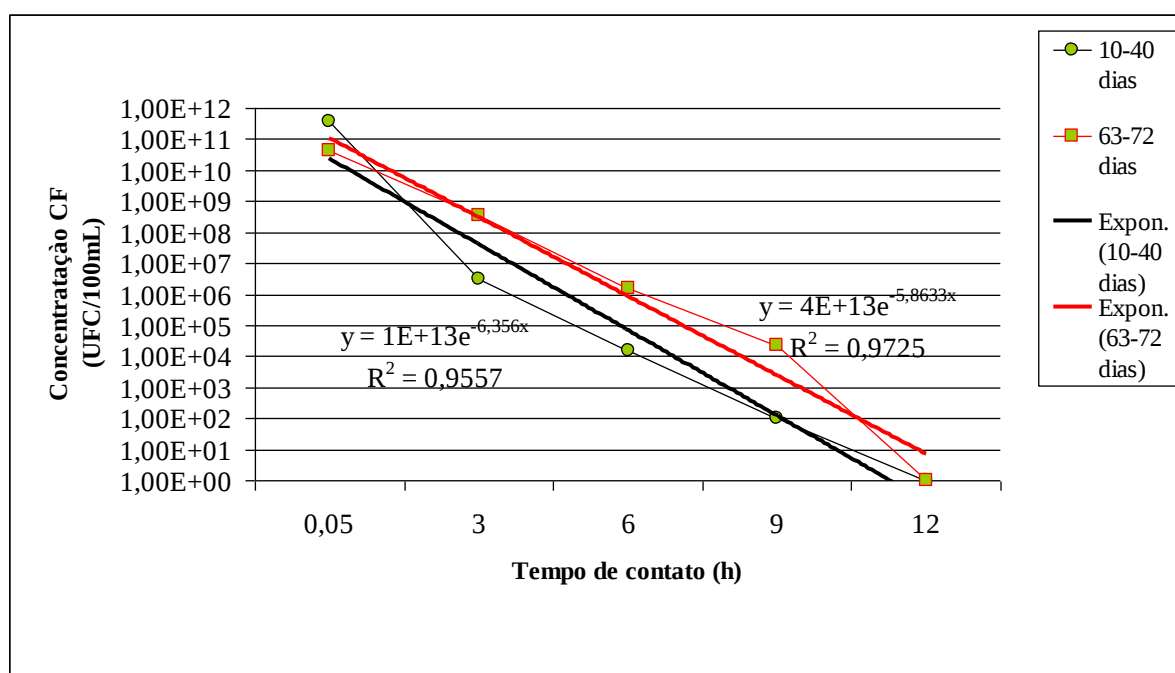


Figura 5.5 - Correlação entre a concentração de CF (UFC/100mL) e os tempos de contato (h) no biorreator (*Chlorella* sp.) e no controle (sem algas) para os tratamentos com luz artificial, com representação dos coeficientes regressão (R^2), linhas de tendência (exponencial) e médias das triplicatas dos experimentos, e com tempo de imobilização na matriz de 10 a 40 dias (vermelho) e 63 a 72 dias (preto).

Conforme a figura 5.5, as linhas de tendência exponenciais de redução das concentrações de CF, em relação aos tempos de contato, praticamente, foram idênticas durante os diferentes experimentos sob luz artificial, indicando que as células continuaram viáveis e não perderam a capacidade desinfetar os afluentes contaminados. Demonstrando que esses biorreatores sob fonte de fótons artificial podem continuar eficientes por mais de 2 meses de uso, mesmo com variação da carga de nutrientes e da concentração de microorganismos fecais.

Os valores do coeficiente de decaimento (K_b) de CF nestes experimentos com irradiação artificial por 24h, demonstraram correlação com o aumento do tempo de contato durante o tratamento e estão representados na tabela 5.2.

Tabela 5.2: Valores do coeficiente de decaimento (K_b), do percentual de eficiência (%E) dos experimentos (10-72 dias de imobilização) com luz artificial em relação aos tempos de contato (d).

Tempo de contato (d)	0,125	0,25	0,375	0,5
K_b	7,21	14,52	17,11	22,51
%E	99,950000%	99,999800%	99,9999996%	100%

Conforme se observa na tabela 5.2 os valores de K_b variaram entre 7,21 e 22,51d⁻¹, e apresentaram relação significativa com o aumento do tempo de contato igual ou superior à 3h (0,125d). Os valores obtidos com esse coeficiente de degradação bacteriana indicam que o tempo de contato é fator essencial para obtenção de depurações significativas, pois tempos de contato reduzidos não demonstraram eficiência na remoção de CF.

5.2 TRATAMENTO SOB LUZ SOLAR

Após os experimentos sob luz artificial as microalgas (*Chlorella*) foram imobilizadas nas mesmas condições dos experimentos anteriores. Os afluentes contaminados foram tratados, coletados e analisados as concentrações de CF (UFC/100mL) para os tempos de contato 0,05h, 0,5h, 1h, 3h e 6h. As figuras 5.6 e 5.7 foram geradas a partir da análise estatística dos valores de redução da concentração de CF, observados em seis experimentos sob irradiação solar.

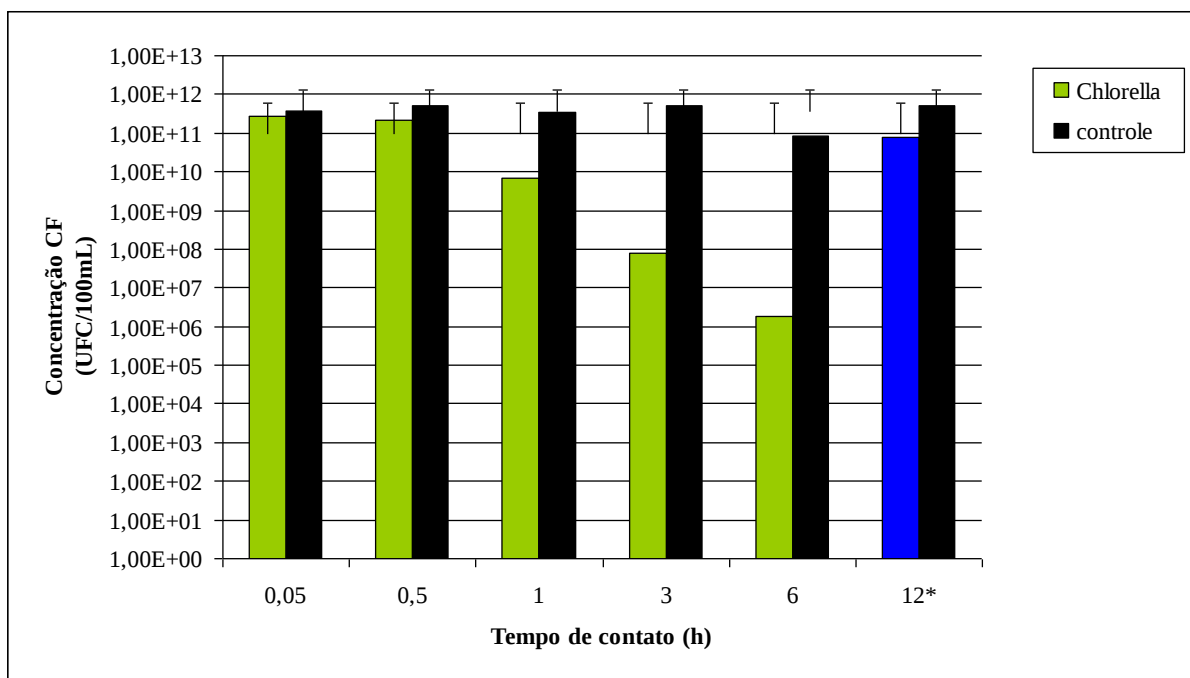


Figura 5.6 - Gráfico das concentrações CF (UFC/100mL) em relação aos tempos de contato (h) no biorreator (verde) com microalgas (*Chlorella*) e no controle (preto) sem algas. Os valores correspondem às médias de triplicatas de seis experimentos com irradiação solar direta por 6h e com algas imobilizadas na matriz entre 10 e 30 dias. O máximo desvio padrão ($\pm$) obtido em cada coluna foi representado para $p < 0,05$. O tempo de contato 12* (azul) corresponde à 12h na ausência de fótons (período noturno) e é representativo de dois experimentos.

De acordo com a figura 5.6 nos seis experimentos laboratoriais com luz solar observou-se redução na concentração bacteriológica fecal, em relação ao controle, para os tempos de contato de 0,05 (33%), 0,5h (55%), 1h (98%), 3h (99,95%) e 6h (99,999%). Esses valores obtidos indicaram redução significativa média de 99,9% (3 log) na concentração de CF a partir de 3h de contato dos afluentes contaminados com a matriz de microalgas imobilizadas.

O controle (sem algas) que foi submetido à luz solar, também, apresentou alguma redução na concentração CF (90%) do afluente contaminado para $p < 0,05$ (ANOVA – fator único), porém apenas após o tempo de contato de 6h.

O tempo de contato de 12h* sem incidência de fótons (escuro) apresentou baixa eficiência na redução de CF em relação ao controle (figura 5.6). Convém ressaltar, que esta baixa remoção de CF ocorreu devido à ausência de incidência luminosa, que provavelmente, reduziu a atividade fotossintética (concentração de OD) e metabólica das algas, bem como, os

valores de pH no sistema.

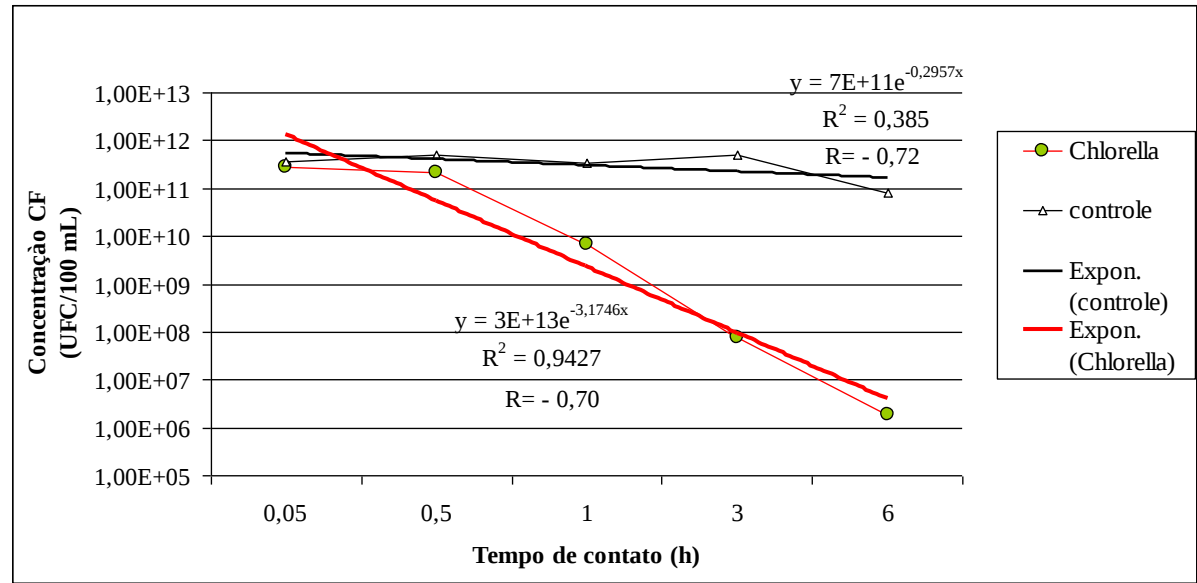


Figura 5.7 - Gráfico da correlação entre a concentração de CF (UFC/100mL) após os respectivos tempos de contato (h) no biorreator (*Chlorella* sp.) e no controle (sem algas), com representação dos coeficientes correlação (R) e regressão (R^2), linhas de tendência (exponencial) e médias das triplicatas de seis experimentos irradiados por 6h com luz solar e com tempo de imobilização na matriz entre 10 e 30 dias.

Os valores do coeficiente de decaimento (Kb) destes experimentos sob irradiação solar por até 6h demonstraram correlação com o aumento do tempo de contato, e estão representados na tabela 5.3.

Tabela 5.3: Valores do coeficiente de decaimento (Kb), do percentual de eficiência (%E) dos experimentos (10-30 dias de imobilização) com luz natural em relação aos tempos de contato (d).

Tempo de contato (d)	0,021	0,04	0,125	0,25
Kb	-3,06	0,68	6,69	9,27
%E	55%	98%	99,995%	99,998%

Os valores do coeficiente de degradação de CF (Kb) nos tratamentos sob luz solar variaram entre 0,68 e 9,27 d⁻¹. A partir do tempo de contato de 1h (0,04d) obteve-se um eficiente decaimento bacteriano e esses valores indicam que o tempo de contato foi fator determinante na desinfecção, pois tempos menores que 1h apresentaram valores de Kb negativos e pequenos percentuais de remoção de CF.

A figura 5.8 demonstra o gráfico da correlação dos valores de Kb com o tempo de

contato (d), sendo que os coeficientes de morte bacteriana representados para os contatos de 3 e 6 horas são a média de todos os experimentos realizados sob luz artificial e solar com os biorreatores de microalgas imobilizadas.

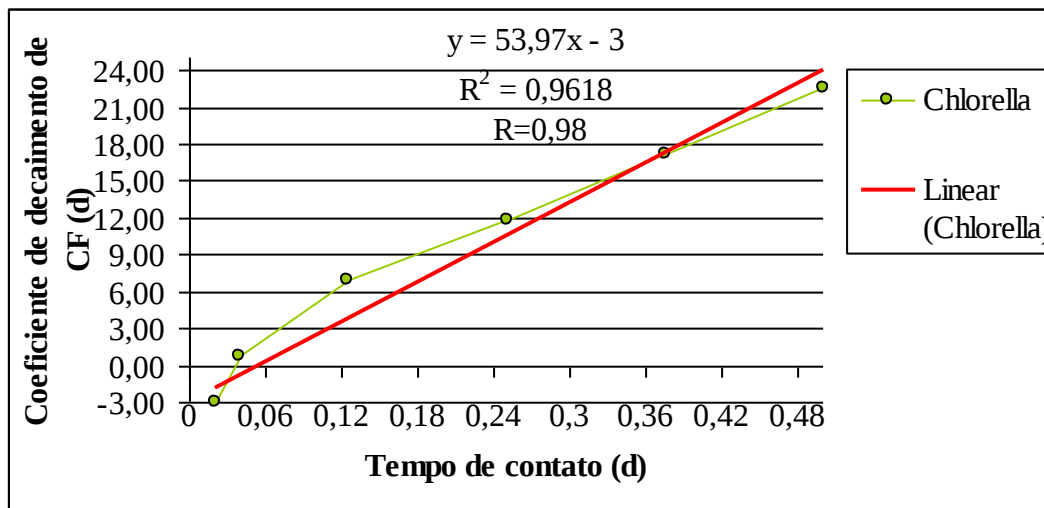


Figura 5.8 - Gráfico da correlação entre o coeficiente médio de decaimento de coliformes fecais e o tempo de contato em dias, com o coeficiente de regressão e linha de tendência (regressão linear).

Conforme a figura 5.8 as médias do coeficiente de degradação de CF (Kb) de todos os experimentos irradiados (n=14) demonstrou significativa correlação ($R=0,98$) com o aumento do tempo de contato (d). Indicando que, com a elevação do tempo se obtêm maiores desinfecções nos efluentes tratados com esses biorreatores.

Os valores de pH variaram pouco durante os diferentes experimentos realizados sob irradiação solar e artificial (tabela 5.4). Os valores alcalinos (acima de 8) foram obtidos nos biorreatores após os tempos de contato de 3h.

Nos controles os valores de pH mantiveram-se próximos ao neutro. Estes dados indicam que a elevação do pH foi essencial à desinfecção e é consequência direta da atividade das algas no sistema. A eficiente capacidade de redução deste IMP no biorreator e os demais dados indicam que a alcalinidade, a temperatura acima de 30°C , a atividade celular das microalgas e a irradiação de fótons sob os efluentes atuaram em conjunto para elevar a ação bactericida deste sistema biológico de tratamento.

A interpretação dos resultados demonstra que ambas fontes luminosas, que incidiram diretamente sobre as colunas, foram eficientes no fornecimento de fótons para a desinfecção, bem como, para gerar pH básico nos efluentes tratados pelas matrizes com

microalgas-verdes imobilizadas.

Conforme a tabela 5.4, os tempos de contato 0,05 e 0,5h nos biorreatores foram os que apresentaram os mais baixos valores de pH (próximo ao neutro), durante todos os experimentos irradiados com luz.

Tabela 5.4: Valores de pH nos efluentes tratados nos reatores (*Chlorella* e controle) após os diferentes tempos de contato.

Tempo de contato (h)	<i>Chlorella</i>	Controle
0,05	7,23 ±0,1	7,35 ±0,2
0,5	7,25 ±0,5	7,20 ±0,3
1	7,73 ±0,3	7,15 ±0,2
3	8,35 ±0,2	7,41 ±0,3
6	8,33 ±0,1	7,22 ±0,2
9	8,59 ±0,4	7,57 ±0,1
12	8,90 ±0,5	7,75 ±0,5

Nota: Médias e erro padrão (±) representativos de triplicatas de oito experimentos com luz artificial e seis com luz natural para $p < 0,05$ (ANOVA – fator único).

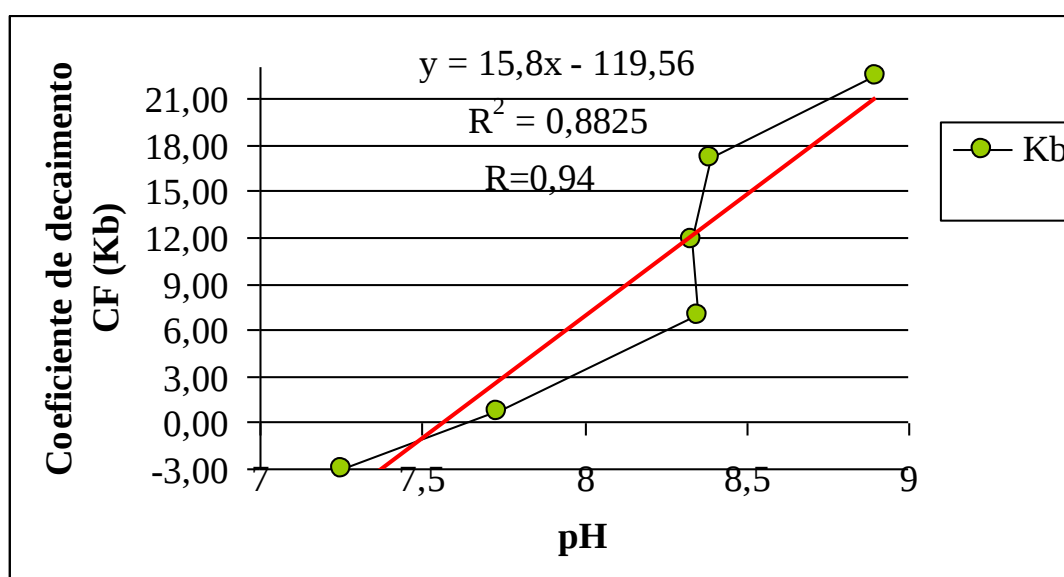


Figura 5.9 - Gráfico da correlação entre o coeficiente médio de decaimento de coliformes fecais e os valores de pH, com o coeficiente de correlação, regressão e linha de tendência (regressão linear).

Conforme demonstrado na figura 5.9 o coeficiente de decaimento de CF apresentou correlação com ao aumento do pH ($R=0,94$). Indicando que a degradação

bacteriana obtida tem relação direta com os valores de pH alcalinos que foram obtidos após 3h de tempo de contato.

Nos tempos de contato de acima de 3 horas, confirmou-se a eficaz capacidade de desinfecção dos biorreatores com “beads” íntegros e uniformes de tamanho médio de 4 mm, contendo concentração média de microalgas de 10^6 células.beads⁻¹ e na concentração de 40 beads.mL⁻¹ de efluente contaminado.

De acordo com a interpretação dos dados observados nesses experimentos sob luz artificial e solar, demonstram-se irrelevantes e insignificantes as reduções de CF no reator sem algas (controle). Sugerindo, que durante esses experimentos, os mecanismos físicos (absorção) e químicos dos géis de alginato de cálcio foram incapazes de reduzir a concentração desses indicadores de bactérias entéricas patogênicas (IMP). Logo, a matriz de alginato de cálcio (“beads”) sem algas imobilizadas, demonstrou ineficaz na desinfecção bacteriológica de efluentes contaminados com CF. As avaliações indicaram e ressaltaram, também, que pequenos tempos de contato são incapazes de promover remoção significativa de CF para $p < 0,05$, mesmo com elevadas concentrações de algas e sob irradiação solar.

Através da análise dos resultados obtidos com esses dezesseis experimentos laboratoriais de tratamento biológico terciário, observa-se que a incidência luminosa sob os biorreatores, bem como, a conseqüente atividade fotossintetizante realizada pelas microalgas-verdes, foi essencial ao decaimento desses IMP (CF) nos efluentes tratados com tempos de contato iguais ou superiores à 3h, tendo em vista que, tempos de contato menores que 1h e o tempo de 12h* sem incidência direta de fótons não apresentaram reduções logarítmicas significativas.

As concentrações de microalgas (3,7µg. bead⁻¹) e matriz (44 beads.mL⁻¹) com volume total aproximado de 22cm³ de matriz de alginato de cálcio e 10mL de efluente tratado pelo sistema de batelada foram eficientes na desinfecção de águas residuais contaminadas com CF, desde que, os reatores com microalgas sejam irradiados por mais de 3h com fonte de fótons natural ou artificial.

6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Os oito tratamentos terciário sob luz artificial e os seis sob luz solar demonstraram reduções médias de 99% (2 log) na concentração de CF a cada 3 horas de contato do afluente com a matriz contendo microalgas imobilizadas (*Chlorella*), em relação a matriz sem algas (controle). A partir do tempo de contato de 12h obteve-se remoção completa das bactérias indicativas de contaminação fecal durante esses experimentos com incidência luminosa.

A obtenção de valores de pH alcalino colaborou para a desinfecção eficiente desses efluentes contaminados com CF, provavelmente, devido ao metabolismo das microalgas-verdes. Confirmando assim, a eficiência significativa desse tratamento terciário com microalgas imobilizadas sob condição de clima quente.

As desinfecções observadas nestes experimentos indicam que sob essa condição favorável de fótons, os sistemas com microalgas são eficazes na redução da concentração de CF. Os valores básicos de pH e as temperaturas acima de 28⁰C desempenharam papel fundamental na eficiência bactericida (CF) deste sistema, bem como, a provável a atividade metabólica e fotossintetizante das microalgas, e seu conseqüente aumento da concentração de OD.

Desta forma, recomenda-se à utilização e avaliação desses biorreatores com microalgas (*Chlorella* sp.) imobilizadas, em escala-piloto e sob fluxo contínuo, em regiões de clima quente do país. Pois além da eficiente desinfecção, este sistema possibilita menores perdas hídricas por evaporação, menor produção de subprodutos de desinfecção e redução dos riscos à saúde pública e ao meio ambiente. Esse tratamento biológico aumentando as possibilidades de reúsos dos efluentes tratados.

Comparando a eficiência do sistema de microalgas imobilizadas com o sistema de lagoas de maturação, onde as algas encontram-se dispersas (livres) e são necessários até 5 dias de retenção para redução de até 99.9% (3 log) na concentração de CF. Estes biorreatores tem eficiência tão elevada quanto as lagoas, porém com tempo de contato 40 vezes menor. Convém destacar, que para o sistema de lagoas de estabilização são necessárias grandes áreas para instalação e construção e devem ser bem estabelecidas as condições ideais de configuração para obtenção de desinfecção satisfatória.

Para a desinfecção com cloro, necessita-se tempo de contato de 30min para significativas reduções, porém as doses utilizadas e os custos são elevados, e sempre existe o

risco de contaminação humana e do meio ambiente com resíduos deste elemento.

Conforme os dados obtidos neste trabalho, os indicativos de poluição microbiológica fecal (CF) foram significativamente reduzidos nos efluentes submetidos ao tratamento biológico com microalgas imobilizadas em relação ao controle (sem algas). Desta forma, confirma-se e ressalta-se o dinâmico e importante papel das microalgas verdes imobilizadas na remoção de microrganismos patogênicos de efluentes contaminados. Bem como, a eficiente o aumento viabilidade celular e durabilidade quando imobilizadas em matriz de alginato de cálcio.

O tratamento de efluentes eutrofizados e/ou contaminado por bactérias entéricas patogênicas através deste sistema biológico de tratamento hídrico demonstrou ser viável para região nordeste do Brasil.

Recomenda-se a ampliação deste sistema em escala piloto no regime hidráulico de fluxo contínuo, com avaliação da remoção dos principais IMP (vírus, protozoários e helmintos) e a aplicação constante de fótons com luz solar no período diurno e artificial no período noturno, para aumentar a eficiência fotossintetizante das microalgas e a capacidade bactericida do biorreator.

REFERÊNCIAS

- APHA. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th Edition. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington, DC.
- BAUDISOVA, D. 1997. Evaluation of *Escherichia coli* as the main indicator of faecal pollution. Water Science and Technology, vol. 35, N. 11-12, 333-336 p.
- BICUDO, C. E. M. & BICUDO, R. M. T. 1970. Algas de Águas Continentais Brasileiras. Fund. Bras. Des. Ens. Ciênc. São Paulo, Brasil. 228 p.
- BISCHOFF, H. W. & BOLD, H. C. 1963. Physiological studies. IV. Some algae from Enchanted Rock and related algae species. University of Texas Publications, vol. 6318, 1-95 p.
- BOROWITZKA, M. A. 1988. Micro-algal Biotechnology Cambridge University Press. Cambridge.
- BOWEN, J. E.; GAUCH, H. G.; KRAUSS, R. W.; GALLOWAY, R. A. 1965. The nonessentiality of boron for *Chlorella*. Journal of Phycology, vol. 1, 151-154 p.
- BRUNENTON, J. 1993. Pharmacognosie, phytochimie, plantes medicinales. 2 ed. Paris: Lavoisier.
- BUSCHINI, A.; MARTINO, A.; GUSTAVINO, B.; MONFRINOTTI, M.; POLI, P.; ROSSI, C.; SANTORO, M.; DÖRR, A. J. M.; RIZZONI, M. 2004. Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization. Mutation research, v. 557, 119 -129 p.
- CURTIS, T. P. & MARA, D. D. 1994. The effect of sunlight on mechanisms for the die-off of faecal coliform bacteria in waste stabilization ponds. University, of Leeds.
- DAVIS-COLLEY, R. J.; DONNISON, A. M.; SPEED, D. J. 1997. Sunlight wavelengths in a faecal indicator microorganisms in waste stabilization ponds. Water Science and Technology, vol. 35, n. 11-12, 219-225 p.
- DE-BASHAN, L. E.; MORENO, M.; HERNANDEZ, J. P.; BASHAN, Y. 2002. Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the micro-algae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the micro-algae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. Water Res., vol. 36, 2941-2948 p.
- DIXO, N. G. H.; GAMBRILL, M. P.; CATUNDA, P. F. C.; VANHAANDEL, A. C. 1995. Removal of pathogenic organism from the effluent of an upflow. Water Science and Technology, vol. 31, n. 12, 275-284 p.
- EDBERG, S. C.; RICE, E. W.; KARLIN, R. J.; ALLEN, M. J. 2000. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. J. Appl. Microbiol. Vol. 88, 106-116 p.
- EPA. 2001. Controlling disinfection by-products and microbial contaminant in drinking water (EPA/600/R-01/110).

- FORREST, J.M. 1998. The use of immobilized algae for removal of bacterial pathogens from wastewater. Honours Project. University of Liverpool.
- GLEESON, C. & GRAY, N. 1997. The coliforms index and waterborne disease, problems of microbial drinking water assessment. E&FN Spon, London.
- GUERRERO, M. G., VEJA, J. M.; LOSADA, M. 1981. The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. Annual Review of Plant Physiology, 32, 169–204 p.
- GONÇALVES, R. F. (coord.). 2003. Desinfecção de efluentes sanitários. PROSAB 3, 438 p.
- HALLIWELL, B. & GUTTENRIDGE, J. M. C. 1999. Free Radicals in Biology and Medicine, 107-313 p.
- INGRAM, M. 1977. The significance of index and indicator organisms foods. Presented at Int. Symp. IUMS Comm. Food Microbil. Hygiene, 10 th, Szczecin, Poland. Lancet 2, 1425 p.
- KANAZAWA, T., YUHARA, T. & SASA, T. 1958. Mass culture of unicellular algae using the 'open circulation method'. Journal of General and Applied Microbiology, v. 4, 135 – 152 p.
- KOMULAINEN, H. 2004. Experimental Cancer Studies of Chlorinated by-products. Toxicology, v. 198, 239 – 248 p.
- KRAUSS, R. W. 1958. Physiology of the fresh-water algae. Annual Review of plant Physiology, vol. 9, 207-244 p.
- LALIBERTÉ, G.; PROULX, D.; DE PAUW, N.; DE LA NOÛE, J. 1994. Algal technology in wastewater treatment. In: Algae and Water Pollution, Rai, L.C., J.P. Gaur, C.J. Soeder (Eds.), Berlin, Archiv für Hydrobiology, vol. 42, 283-302 p.
- LAU, P. S.; TAM, N. F. Y.; WONG, Y. S. 1997. Wastewater nutrients (N and P) removal by carrageenan and alginate immobilized *Chlorella vulgaris*. Environmental Technology, vol. 18, 945-951 p.
- LECLERC, H.; MOSSEL, D. A. A.; EDBERG, S. C.; STRUIJK, C. B. 2001. Advances in the bacteriology of coliform group: their suitability as markers of microbial water safety. Annu. Ver. Microbiol., vol. 55, 134-201 p.
- MARA, D. D.; PEARSON, H. W. 1999. A hybrid waste stabilization pond and wastewater storage and treatment reservoir system for wastewater reuse for both restricted and unrestricted crop irrigation. Water Research, vol. 33, n. 2, 591-594 p.
- MALLICK, N.; RAI, L.C., 1993. Influence of culture density, pH, organic acids and divalent cations on the removal of nutrients and metals by immobilized *Anabaena doliolum* and *Chlorella vulgaris*. World Journal of Microbial Biotechnology, vol. 9, 196-201 p.
- MYERS, J. 1980. On the algae: thoughts about physiology and measurements of efficiency. In Primary Productivity in the Sea, ed. P. G. Falkowski, New York: Plenum Press, 1-16 p.
- MEGHARAJ, M.; PEARSON, H. W.; VENKATESWARLU, K. 1992. Removal of nitrogen and phosphorus by immobilized cells of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus bijugatus* isolated from soil. Enzyme, Microbiology and Technology, vol. 14, 656-658 p.

- PAGE, M. F. 2000. Immobilized algal systems for the removal of bacteria and viruses in wastewater treatment technology. Honours project. University of Liverpool.
- Parhad N.M. and Rao, N.V. 1974. Effect of pH on survival of E.coli. Journal of the Water Pollution Control Federation 46, 980-986.
- PEARSON, H. W. 1986. Estimation of chlorophyll-a as a measure of algae biomass in waste stabilization ponds. In Proceedings of the regional Seminar on the Waste Stabilization Pond Research, 3-7 March. Pan American Center for Sanitary Engineering and Environment Sciences, Lima.
- PEARSON, H. W.; MARA, D. D.; BARTONE, C.R. 1987 (a). Guidelines for the minimum evaluation of the performance of full-scale waste stabilization ponds systems. Water Research, vol. 21, n. 9, 1067-1075 p.
- PEARSON, H. W.; MARA, D. D.; MILLS, S. M.; SMALLMAN, D. J. 1987 (b). Factors determining algal populations in waste stabilization ponds and the influence of algae on pond performance. Water Science and Technology, vol. 19, 131-140 p.
- RANGEBY, M.; JOHANSSON, P.; PERNUP, M. 1996. Removal of fecal coliforms in a wastewater stabilization pond. Water Science and Technology, vol. 34, n. 11, 149-157 p.
- ROBINSON, P. K.; DAINITY, A. L.; GOULDING, K. H.; SIMPKINS, I.; TERVAN, M.D. 1985. Physiology of alginate-immobilized *Chlorella*. Enzyme, Microbiology and Technology, vol. 7, 212-216 p.
- ROBINSON, P. K.; REEVE, J. O.; GOULDING, K. H. 1988. Kinetics of phosphorus uptake by immobilized *Chlorella*. Biotechnology Letter, vol. 10, 17-20 p.
- SIAN, R. 1984. Ammonia uptake by *Chlorella vulgaris* immobilised by calcium-alginate beads for the application in the nutrient stripping of treated waste water. Honours project. University of Liverpool.
- SMALLMAN, D. J. 1986. An ecological appraisal of waste stabilization pond performance. PhD Thesis, University of Leeds.
- SRIVASTAVA, R. & KULSHRESHTHA, D. K. 1989. Bioactive polysaccharides from plants. Phytochemistry, vol. 28, 2877-2883 p.
- SUASSUNA, K. 2001. Campanha de Substâncias e Tecnologias Tóxicas. Greenpeace, São Paulo–Brasil.
- TAM, N.F.Y.; LAU, P.S.; WONG, Y.S. 1994. Wastewater inorganic N and P removal by immobilized *Chlorella vulgaris*. Water Science and Technology, vol. 30, 369-374 p.
- TAM, N. F. Y.; WONG, Y. S. 2000. Effect of immobilized micro-algal bead concentrations on wastewater nutrient removal. Environmental Pollution, vol. 107, 145-151 p.
- TIEN, C. J. 2002. Biosorption of metal ions by freshwater algae with different surface characteristics. Process Biochemistry, vol. 38, 605-613 p.
- USEPA, 1999. "US Environment Protection Agency". In: National Primary Drinking Water Regulations Current Drinking Water Standards. Office of water. Washington.

WALKER, J. B. 1953. Inorganic micronutrient requirement of *Chlorella*. Requirements for calcium (or strontium), copper and molybdenum. Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 46, 1-11 p.

WARBURG, O. 1919. Über die Geschwindigkeit der photochemischen Kohlensäure-zersetzung in lebenden Zellen. Biochemische Zeitschrift, vol. 100, 230-270 p.

WEF. 1996. Wastewater disinfection, FD-10. Water Environment Federation.

WHO, 1989. Health guidelines for the use of wastewater in agriculture and aquaculture. Technical Report Series n. 778, World Health Organization, Geneva.

**APÊNDICE – TABELAS DAS CONCENTRAÇÕES DE COLIFORMES
FECAIS NOS REATORES *CHLORELLA* E CONTROLE SOB LUZ ARTIFICIAL
(N=8), SOLAR (N=6) E ESCURO (N=2)**

Concentração de coliformes fecais (CF/100mL) nos reatores <i>Chlorella</i> e controle sob luz artificial (n=8)								
N	Tratamento	Tempo de contato (h)						Imobilização (dias)
		0,05	3	6	9	12	24	
1	<i>Chlorella</i> sp.	3,50E+10 ±0,5	1,00E+08 ±1,0	1,00E+06 ±1,0	1,00E+04 ±1,2	0,00 ±0,4	0,00 ±2,7	10 a 40
	Controle	4,03E+10 ±0,1	4,70E+10 ±1,7	5,50E+11 ±0,4	3,70E+11 ±0,3	3,50E+11 ±0,2	5,40E+11 ±0,8	
2	<i>Chlorella</i> sp.	5,00E+10 ±1,0	1,50E+09 ±1,0	1,00E+06 ±1,0	1,00E+04 ±1,0	0,00 ±0,6	0,00 ±2,0	
	Controle	5,30E+10 ±1,7	6,80E+10 ±0,8	1,80E+11 ±0,6	1,16E+11 ±0,2	1,40E+11 ±0,5	1,90E+11 ±0,4	
3	<i>Chlorella</i> sp.	7,80E+10 ±0,1	1,00E+08 ±1,6	1,00E+06 ±1,0	3,00E+04 ±2,0	0,00 ±1,0	0,00 ±0,5	
	Controle	3,00E+11 ±1,0	1,40E+11 ±0,2	4,50E+09 ±0,6	2,90E+10 ±0,4	2,60E+10 ±0,3	4,60E+10 ±1,0	
4	<i>Chlorella</i> sp.	4,70E+10 ±1,7	1,30E+08 ±0,3	2,60E+06 ±0,9	3,30E+04 ±0,9	0,00 ±0,2	0,00 ±1,7	
	Controle	8,90E+11 ±1,8	8,90E+11 ±1,8	8,90E+11 ±1,8	1,80E+11 ±0,3	1,80E+11 ±0,3	1,80E+11 ±0,3	
5	<i>Chlorella</i> sp.	8,60E+10 ±2,0	1,00E+08 ±1,0	2,00E+06 ±0,3	1,60E+04 ±0,3	0,00 ±3,0	0,00 ±0,9	
	Controle	5,10E+11 ±0,2	5,10E+11 ±0,2	5,10E+11 ±0,2	7,20E+11 ±0,5	7,20E+11 ±0,5	7,20E+11 ±0,5	
6	<i>Chlorella</i> sp.	9,70E+10 ±1,7	1,30E+08 ±0,3	1,60E+06 ±0,3	2,00E+04 ±0,2	0,00 ±2,3	0,00 ±2,4	
	Controle	5,50E+11 ±0,5	5,50E+11 ±0,5	5,50E+11 ±0,5	6,90E+11 ±0,6	6,90E+11 ±0,6	6,90E+11 ±0,6	
7	<i>Chlorella</i> sp.	3,60E+11 ±0,5	3,10E+06 ±1,4	1,60E+04 ±0,7	1,20E+02 ±0,1	0,00 ±2,7	0,00 ±1,6	63 a 72
	Controle	3,60E+11 ±0,4	3,60E+11 ±0,4	3,60E+11 ±0,4	2,90E+11 ±0,4	2,90E+11 ±0,4	2,90E+11 ±0,4	
8	<i>Chlorella</i> sp.	3,70E+11 ±0,5	1,40E+06 ±0,3	2,00E+04 ±0,5	1,00E+02 ±0,3	0,00 ±2,9	0,00 ±1,2	
	Controle	4,10E+11 ±0,4	4,10E+11 ±0,4	4,10E+11 ±0,4	2,00E+11 ±0,1	2,00E+11 ±0,1	2,00E+11 ±0,1	

NOTA: Nos cinco últimos experimentos os valores representados nos controles para os tempos de contato de 0,05h e 3h são representativos do controle com tempo de contato de 6h, e os valores dos controles tempos de contato 9h e 12h são representativos do tempo de contato de 24h.

Concentração de coliformes fecais (CF/100mL) nos reatores Clorela e controle sob luz solar (n=6)							
N	Tratamento/Tempo	Tempo de contato (h)					Imobilização (dias)
		0,05	0,5	1	3	6	
1	<i>Chlorella</i> sp.	3,00E+11 ±0,7	9,50E+10 ±1,5	7,30E+09 ±0,5	7,50E+09 ±0,5	2,00E+08 ±0,3	10 a 30
	Controle	4,20E+11 ±0,3	3,70E+11 ±0,1	2,00E+11 ±0,5	5,50E+11 ±0,4	9,50E+10 ±0,3	
2	<i>Chlorella</i> sp.	3,90E+11 ±0,7	8,40E+10 ±0,9	8,00E+09 ±0,5	9,00E+09 ±0,6	1,50E+08 ± 0,1	
	Controle	4,60E+11 ±0,5	2,40E+11 ±0,4	6,50E+11 ±0,4	1,50E+11 ±0,1	7,80E+10 ±0,2	
3	<i>Chlorella</i> sp.	2,20E+11 ±0,7	8,80E+10 ±1,5	6,30E+09 ±0,2	1,30E+09 ±0,5	2,60E+08 ± 0,4	
	Controle	1,70E+11 ±0,3	4,10E+11 ±0,8	9,50E+11 ±0,1	5,10E+11 ±1,2	7,00E+10 ±0,3	
4	<i>Chlorella</i> sp.	3,90E+11 ±0,3	1,50E+10 ± 0,6	1,60E+09 ±0,2	3,50E+09 ±0,4	2,00E+06 ±0,3	
	Controle	2,50E+11 ±0,6	2,50E+11 ±0,6	2,50E+11 ±0,6	2,50E+11 ±0,6	1,50E+10 ±0,3	
5	<i>Chlorella</i> sp.	3,90E+11 ±0,3	3,50E+10 ± 0,1	7,80E+09 ±0,5	3,00E+09 ±0,2	2,60E+06 ±0,3	
	Controle	4,30E+11 ±0,2	4,30E+11 ±0,2	4,30E+11 ±0,2	4,30E+11 ±0,2	1,70E+10 ±0,5	
6	<i>Chlorella</i> sp.	2,00E+11 ±0,7	1,50E+10 ± 0,1	7,70E+09 ±0,2	1,90E+09 ±0,7	1,20E+06 ±0,2	
	Controle	5,10E+11 ±2,0	5,10E+11 ±2,0	5,10E+11 ±2,0	5,10E+11 ±2,0	1,60E+10 ±0,3	

NOTA: Nos três últimos experimentos os valores representados nos controles para os tempos de contato de 0,05h, 0,5h e 1h foram os obtidos nos controles de 3h.

Concentração de coliformes fecais (CF/100mL) nos reatores <i>Chlorella</i> e controle na ausência de fótons (n=2)			
N	Tratamento	Tempo de contato (12h)	Imobilização (dias)
1	<i>Chlorella</i> sp.	8,10E+10 ±0,1	20 a 23
	Controle	4,10E+11 ±0,7	
2	<i>Chlorella</i> sp.	7,60E+10 ±0,5	
	Controle	5,70E+11 ±2,6	

ANEXOS – INGREDIENTES DO MEIO BASAL BOLD'S



Meio Basal “Bold’s”: conveniente para algas azuis e verdes de águas naturais (Bischoff & Bold, 1963).

Seis soluções estoque de macronutrientes foram preparadas em água destilada, cada uma contendo um dos seguintes sais por 400ml:

NaNO ₃	10g	(290 mM)
CaCl ₂ . 2H ₂ O	1g	(17 mM)
MgSO ₄ . 7H ₂ O	3g	(30 mM)
K ₂ HPO ₄	3g	(43 mM)
KH ₂ PO ₄	7g	(129 mM)
NaCl	1g	(27 mM)

Para cada 940ml de água destilada, 10ml de cada solução estoque de macronutrientes foi adicionado e 1ml de cada solução estoque de micronutrientes (elementos traço), que foram preparados conforme abaixo:

1. 50g de Na₂EDTA (134 mM) e 31g de KOH (553 mM) foram dissolvidos em 1 litro de água destilada;
2. 4,98g de FeSO₄ . 7H₂O (18 mM) foram dissolvidos em 1 litro de água acidificada (água acidificada: 1,0 ml de H₂SO₄ dissolvido em 1 litro de água destilada);
3. 11,42g de H₃BO₄ (184 mM) foram dissolvidos em 1 litro de água destilada.
4. Posteriormente foram dissolvidas em 1 litro de água destiladas as seguintes quantidades de elementos traço:

ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8,82g	(31 mM)
MnCl ₂ . 4H ₂ O	1,44g	(7 mM)
MoO ₃	0,71g	(0,05 mM)
CuSO ₄ . 5H ₂ O	1,57g	(6 mM)
Co(NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	0,49g	(2 mM)

Após o meio foi autoclavado e o pH ajustado para 7,0.
