

Cultivo de bactérias nitrificantes a partir do biofilme de filtro biológico aerado submerso tratando esgoto

Técnicas de remoção de nutrientes têm sido empregadas no tratamento de efluentes com a inclusão de uma etapa biológica. Sendo os microrganismos nitrificantes os responsáveis pelas transformações das formas nitrogenadas, o objetivo deste estudo foi detectar e quantificar bactérias nitrificantes provenientes do tratamento de efluentes de um canil. Foi realizada a caracterização do efluente e uma obtida uma correlação entre as variáveis medidas. Avaliou-se a densidade de bactérias nitrificantes e a partir do biofilme coletado no filtro biológico aerado submerso, fez-se o cultivo, isolamento e observação dos microrganismos em microscópio óptico e microscópio eletrônico de varredura. As análises físico-químicas demonstraram um decaimento de nitrogênio amoniacal de 35% entre a entrada e saída do biofiltro. A densidade de bactérias demonstrou variabilidade entre bactérias oxidadoras de amônia (BOA) e de nitrito (BON) no biofiltro, e uma maior densidade de BON em relação as BOA no biofilme. O pH apresentou uma correlação positiva de 72% com as formas nitrogenadas (NHx), e uma correlação negativa de 81% com o nitrito, e estas correlações mostraram-se estatisticamente significativas. A partir da observação em microscópio foram identificadas as bactérias nitrificantes a partir da morfologia. O pH pode ser considerado como o fator limitante para a nitrificação, pois tem relação no crescimento das bactérias. A ocorrência dos microrganismos pode ser verificada tanto no efluente, quanto aderidas ao biofilme e os gêneros Nitrosomonas e Nitrobacter foram identificados.

Palavras-chave: Nitrosomonas; Nitrobacter; Efluente; Canil; NMP; Correlação de Pearson.

Cultivation of nitrifying bacteria from submerged aerated biological filter biofilm treating sewage

Nutrient removal techniques have been employed in the treatment of effluents with the inclusion of a biological step. Since nitrifying microorganisms are responsible for the transformation of nitrogen forms, the objective of this study was to detect and quantify nitrifying bacteria from the treatment of effluents from a kennel. The characterization of the effluent was performed and a correlation between the measured variables was obtained. The density of nitrifying bacteria was evaluated and from the biofilm collected in the aerated submerged biological filter, the microorganisms were cultivated, isolated and observed under an optical microscope and a scanning electron microscope. Physical-chemical analyses showed a 35% decay of ammoniacal nitrogen between the entrance and exit of the biofilter. Bacterial density demonstrated variability between ammonia (BOA) and nitrite (BON) oxidizing bacteria in the biofilter, and a higher density of BON compared to BOA in the biofilm. The pH showed a positive correlation of 72% with nitrogen forms (NHx), and a negative correlation of 81% with nitrite, and these correlations were statistically significant. From microscopic observation, nitrifying bacteria were identified from morphology. The pH can be considered as the limiting factor for nitrification, because it is related to the growth of bacteria. The occurrence of microorganisms can be verified both in the effluent and adhered to the biofilm and the genera Nitrosomonas and Nitrobacter were identified.

Keywords: Nitrosomonas; Nitrobacter; Wastewater; Dog Kennel; NMP; Pearson correlation.

Topic: **Microbiologia Agrícola e Ambiental**

Received: **02/10/2019**

Approved: **26/11/2019**

Reviewed anonymously in the process of blind peer.

Guilherme de Oliveira Martins 
Universidade Federal de Lavras, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/5772927402427424>
<http://orcid.org/0000-0002-3964-4335>
guilherme.ambientalufla@gmail.com

Aline dos Reis Souza 
Universidade Federal de Lavras, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/4636150479763078>
<http://orcid.org/0000-0002-9643-3614>
alinerreisouza@yahoo.com.br

Marcelo Vieira da Silva Filho 
Universidade Federal de Lavras, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/5059318976988668>
<http://orcid.org/0000-0003-4290-7180>
marcelofilho@ufla.br

Luciene Alves Batista Siniscalchi 
Universidade Federal de Lavras, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/7511499030309427>
<http://orcid.org/0000-0001-7892-0112>
lucieneabatista@gmail.com



DOI: 10.6008/CBPC2179-6858.2019.006.0008

Referencing this:

MARTINS, G. O.; SOUZA, A. R.; SILVA FILHO, M. V.; SINISCALCHI, L. A. B. Cultivo de bactérias nitrificantes a partir do biofilme de filtro biológico aerado submerso tratando esgoto. **Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais**, v.10, n.6, p.77-91, 2019. DOI: <http://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2019.006.0008>

INTRODUÇÃO

O nitrogênio é um elemento químico de extrema importância para a vida na Terra. Ele é um dos principais constituintes dos seres vivos e do crescimento de plantas; é encontrado em meteoritos, gases vulcânicos e no solo e representa 78% do volume da atmosfera terrestre. No entanto, devido à forma molecular do nitrogênio disponível na atmosfera (N_2), apenas alguns organismos, principalmente bactérias, podem realizar a fixação de N_2 da atmosfera e torna-lo disponível para as plantas (GALEMBECK et al., 2016).

Durante seu ciclo, o nitrogênio passa por processos conhecidos como fixação, nitrificação, assimilação, mineralização e desnitrificação. O nitrogênio apresenta uma grande dinâmica no ambiente e a partir de atividades antrópicas pode contaminar águas superficiais e subterrâneas (CADONÁ et al., 2018). Tendo em vista que a maior carga poluente que atinge corpos hídricos é proveniente do despejo de efluentes, são empregados sistemas de tratamento nos quais ocorre a redução das concentrações de compostos nitrogenados. Sendo esta remoção intimamente ligada a uma etapa biológica, há a diminuição de impactos ao meio ambiente (VON SPERLING, 2014).

O tratamento biológico pode ser considerado compatível com o meio ambiente e de custo reduzido, pois os compostos dos efluentes servem de substrato para os microrganismos, que são os responsáveis pela degradação de nutrientes nesta etapa do tratamento (QUEIROZ et al., 2019). É importante avaliar o potencial de aplicação dos microrganismos em processos como o tratamento de efluentes e quais são suas relações com o meio, visando aumentar a eficiência do processo e a redução de impactos. Sendo assim, objetivou-se neste trabalho detectar, quantificar e isolar bactérias nitrificantes provenientes do tratamento de efluentes de um canil relacionando a densidade de bactérias oxidadoras de amônia (BOA) e oxidadoras de nitrito (BON) ao processo de nitrificação e as variáveis físico-químicas do efluente analisado.

REVISÃO TEÓRICA

Nitrogênio e o meio ambiente

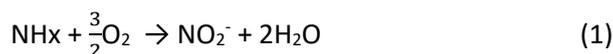
Além de sua forma gasosa, o nitrogênio (N) se encontra no ambiente em diferentes estados de oxidação e multiplicidade de formas. Na sua forma orgânica pode ser encontrado em proteínas, peptídeos, aminoácidos e como bases nitrogenadas formando os ácidos nucleicos. Suas formas inorgânicas incluem a amônia (NH_3), íons nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-). Como o nitrogênio é um macro nutriente essencial às plantas, deve estar disponível no solo para o crescimento dos vegetais. Sua ciclagem garante que o N esteja disponível, garantindo o equilíbrio do ecossistema. Como o N é incorporado à cultura agrícola durante seu crescimento, há a necessidade de aplicação deste elemento no solo para garantir sua produtividade (CARDOSO, 2013). Após seu ciclo de vida, as plantas são decompostas por microrganismos em que o N orgânico presente nos tecidos vegetais, é transformado em íon amônio (NH_4^+), o qual pode ser transformado em nitrato pelo processo de nitrificação (MARTINELLI, 2007).

O ciclo biogeoquímico do nitrogênio é intimamente ligado aos microrganismos, e estes são responsáveis pela sua fixação e processos de oxidação (GUAIMACUTO, 2014). A fixação (redução do N_2 à NH_3)

é realizada por determinados procariontes, denominados organismos fixadores de nitrogênio, e neste grupo se encontram bactérias autotróficas e heterotróficas, as quais se distinguem quanto à eficiência do processo de fixação (FREITAS, 2010).

O processo de formação de amônia (amonificação) ocorre durante a decomposição de compostos orgânicos nitrogenados, como aminoácidos e nucleotídeos. Também pode-se citar a geração de NH_3 a partir da redução respiratória do NO_3^- chamado redução dissimilativa do nitrato para amônia (DRNA). A DRNA domina a redução de NO_3^- e NO_2^- em ambientes anóxicos redutores (MADIGAN, 2010).

A nitrificação é um processo de duas etapas que consistem na oxidação de formas nitrogenadas NH_x (NH_3 e NH_4^+) à NO_2^- , e na oxidação de NO_2^- à NO_3^- , e ambas são realizadas por bactérias. Muitas espécies de bactérias e arqueias podem fazer essa oxidação, entre elas os gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* podem ser destacados. Embora o nitrato seja rapidamente assimilado pelas plantas, é altamente solúvel em água e pode ser lixiviado ou desnitrificado em solos encharcados, onde se desenvolvem ambientes anóxicos. A desnitrificação é a redução do nitrato a compostos de nitrogênio gasoso, e é o principal processo pela qual o N_2 e NO são formados biologicamente. A desnitrificação pode auxiliar no tratamento de efluentes pela remoção do nitrato. Sendo assim, a nitrificação produz nitrato, e a desnitrificação consome nitrato (MADIGAN, 2010). A nitrificação pode ser observada conforme as Equações 1 e 2.



A eficiência da nitrificação está ligada a outros fatores como temperatura, pH e alcalinidade, sendo o pH um dos mais limitantes pois pode ser afetado por possíveis flutuações do teor de nitrogênio introduzidas no meio. A amônia ainda pode ser catabolizada anaerobicamente por alguns organismos em um processo denominado anamox. Nesse processo, a amônia é oxidada, utilizando nitrito como aceptor de elétrons originando N_2 como produto final, que é liberado para a atmosfera (MADIGAN, 2010). Sendo as formas predominantes no ambiente a amônia, o íon amônio (NH_4^+), nitrito e nitrato, deve-se conhecer suas relações com o meio e seus potenciais impactos. Segundo Rodrigues (2011) se sabe que:

Os nitratos e nitritos têm grande poder oxidante e são substâncias que tem amplo emprego na indústria alimentícia como conservantes e corantes. Também são encontrados como contaminantes da água potável. Estes agentes oxidantes quando entram na corrente sanguínea, podem provocar a oxidação da hemoglobina formando a metahemoglobina. A metahemoglobina é uma espécie de hemoglobina que não se liga ao oxigênio, portanto é uma forma não funcional oxidada da hemoglobina na forma férrica (Fe^{3+}). A metahemoglobinemia é uma síndrome de etiologias distintas, de prevalência indeterminada, e que reúne alterações congênitas variadas. As manifestações clínicas, mais comuns em crianças, são decorrentes da diminuição da capacidade carreadora de oxigênio e podem resultar em uma pigmentação acinzentada da pele, conhecida como Síndrome do Bebê Azul.

Outro impacto ligado diretamente às formas de nitrogênio disponíveis no ambiente é a eutrofização. A eutrofização pode ser definida como o aumento da concentração de nutrientes, especialmente fósforo e nitrogênio, nas águas naturais e o conseqüente aumento da biomassa de produtores primários (ESTEVES, 1998; JARVIE et al., 2016). As fontes naturais de nitrogênio que chegam as águas naturais são provenientes

da decomposição da matéria orgânica, porém fontes antrópicas têm colaborado com o aumento da concentração desse nutriente; essas fontes incluem o despejo de efluentes, fontes agrícolas (fertilizantes) e a deposição de material particulado proveniente da queima de combustíveis fósseis. A entrada de nutrientes nos corpos d'água é dependente dos diversos usos no entorno da bacia hidrográfica e está intimamente ligado as condições climáticas e características do local (SOUZA et al., 2014).

Legislação vigente para compostos nitrogenados

Diante da necessidade de assegurar a disponibilidade de água de boa qualidade, foi instituída a partir da Lei nº 9.433/1997, a Política Nacional de Recursos Hídricos. Um dos objetivos dessa política é definir que o enquadramento dos corpos d'água assegurem águas com qualidade compatível com seus diversos usos, e diminuir os custos de combate e controle da poluição (BRASIL, 1997).

Além dessas, as Resoluções nº 357 do CONAMA (2005) e nº 430 do CONAMA (2011), dispõem sobre a classificação dos corpos d'água e padrões de lançamento, respectivamente. Em relação às formas químicas de nitrogênio, nas condições de vazão de referência, devem ser analisados estudos ambientais específicos de acordo com as particularidades do corpo hídrico avaliado. No caso do nitrogênio como fator limitante, o valor de nitrogênio total (após oxidação) não deve ultrapassar $1,27 \text{ mgL}^{-1}$ para ambientes lênticos e $2,18 \text{ mgL}^{-1}$ para ambientes lóticos (CONAMA, 2005). Segundo o CONAMA (2011), o padrão de lançamento para nitrogênio amoniacal total é de até $10,0 \text{ mgL}^{-1}\text{N}^{-1}$, porém não há valores definidos para outras formas nitrogenadas, como nitrito ou nitrato.

Para assegurar o controle e a vigilância da qualidade da água captada para consumo humano, o Ministério da Saúde publicou a PRC nº 5, de 28 de setembro de 2017, onde dispõe sobre o padrão de potabilidade da água de distribuição. O controle dos parâmetros de qualidade da água é competência das esferas nacionais, estaduais e municipais e pode variar de acordo com características específicas de corpos hídricos. Já os parâmetros de potabilidade são de responsabilidade do responsável pelo sistema de tratamento e distribuição de água. Sendo assim, nesta Portaria, definiu-se como valor máximo permitido (VMP), concentrações de 10 mgL^{-1} para o nitrato, e 1 mgL^{-1} para o nitrito. Diante da necessidade de atendimento à legislação e como uma forma de proteção aos corpos hídricos, à biota e à saúde pública, são empregadas diversas configurações de sistemas de tratamento de efluentes que visem reduzir, principalmente, a sua carga orgânica. Segundo Fleck (2017), torna-se necessário o aprimoramento das técnicas tradicionais de remoção de nutrientes e o desenvolvimento de novas técnicas tendo em vista a complexidade dos processos visando maximizar a eficiência do tratamento.

Sistemas de tratamento de efluentes

A etapa do tratamento responsável pela remoção de nutrientes é o tratamento secundário, que visa à remoção de matéria orgânica através de mecanismos de degradação biológica, simulando a decomposição de poluentes que ocorrem naturalmente em corpos receptores. De acordo com Von Sperling (2014), a base de todo o processo de tratamento é o contato efetivo entre microrganismos e o material orgânico presente

nos efluentes.

O filtro biológico aerado submerso (FBAS) é um dos processos de tratamento biológico, e configura-se em um modelo de reator conhecido como sistema de aeração por contato. Consiste em um reator preenchido com material poroso e inerte, que possibilita o escoamento de ar e do efluente a partir de tubos perfurados ou membranas. Neste sistema, os microrganismos crescem no meio suporte, sendo que a turbulência garante o contato entre o substrato e a biomassa fixa. Pode-se definir esse sistema como trifásico, onde a fase sólida consiste no meio suporte onde há adesão do biofilme, a fase líquida consistindo no efluente em escoamento e a fase gasosa, que constitui a aeração artificial fornecida ao reator (VON SPERLING, 2014). O FBAS permite a formação de biofilmes, que representa uma comunidade de células sésseis (microrganismos que se aderem a uma matriz e resultam em uma comunidade bacteriana de fisiologia integrada) na qual se observam diferentes fenótipos, metabolismos, fisiologias e transcrições genéticas (ESPER, 2011).

Microrganismos

Uma grande variedade de microrganismos está presente no biofilme, e à medida que a biomassa cresce aderida à superfície do meio suporte, o tamanho dos poros tende a diminuir, causando um aumento da velocidade de escoamento do efluente. Com uma velocidade maior, ocorre a tensão de cisalhamento que desprende parte do material aderido, sendo esta uma forma natural de controle da população microbiana do meio (VON SPERLING, 2014). Os microrganismos são afetados diretamente pelo estado químico e físico de seu ambiente, sendo alguns fatores limitantes para seu crescimento, como a temperatura, pH, disponibilidade de água e oxigênio (WIEGAND et al., 2016).

A partir do conhecimento da diversidade dos microrganismos, e tendo como base o seu metabolismo, pode-se verificar que estes podem ser aplicados em alguns processos. Aquino et al. (2013), descreveram a capacidade de degradação de desreguladores endócrinos e fármacos em efluentes por alguns microrganismos. O potencial biotecnológico das bactérias tem sido abrangente tanto na indústria quanto para aumento da eficiência de um processo, como exemplo a biolixiviação, conforme demonstram Padrão et al. (2012). No tratamento de efluentes, a degradação da matéria orgânica e remoção de nutrientes por microrganismos tem sido uma técnica já consolidada e estudar quais fatores são interferentes nesses processos se torna uma etapa primordial para a melhoria destes.

METODOLOGIA

Caracterização da área de estudo e coleta da amostra

As análises químicas e microbiológicas do presente trabalho foram coletadas da entrada e da saída do filtro biológico aerado submerso da estação de tratamento de efluentes do Parque Francisco de Assis, sediado na zona urbana do município de Lavras – MG, sob as coordenadas geográficas 21°15'47,4''S, 44°56'12,5''W. O parque abriga e trata cães com o propósito de incentivar a adoção responsável. O local

abriga cerca de 450 cães em tem uma área de 7000 m², dispondo de baias para acomodação dos animais. Durante a limpeza das baias é realizada uma raspagem dos dejetos sólidos que são encaminhados para a compostagem. Em seguida, o local é lavado e o efluente gerado é encaminhado para uma ETE instalada no próprio terreno, sendo o sistema ao todo dimensionado para um tempo mínimo de detenção hidráulica (TDH) de 12h e vazão máxima de 20 m³ d⁻¹. De acordo com o monitoramento feito por Souza (2015), a vazão média diária tratada na ETE do parque é de 0,08 L s⁻¹.

O efluente é coletado e direcionado para duas sequências de unidades diferentes. Uma parte é constituída e sequenciada por tratamento preliminar (gradeamento) e primário, que consiste em um decantador de 4m³ e dois tanques sépticos-filtros anaeróbios de 10m³ cada. A outra parte passa por um sistema de gradeamento e é direcionada para dois tanques sépticos-filtros anaeróbios com capacidade de 5m³ cada. Os efluentes das unidades anaeróbias se interceptam em uma estação elevatória, onde são misturados e direcionados para um filtro biológico aerado submerso (FBAS). O efluente após o FBAS é direcionado para seis decantadores secundários de 2m³ cada e três tanques que funcionam como sistemas alagados construídos, um tanque de passagem e por fim é despejado no corpo receptor.

As análises foram realizadas entre setembro e dezembro de 2018. As amostras foram coletadas na entrada e saída do FBAS e acondicionadas em garrafas plásticas de 500 mL e levadas ao Laboratório de Microbiologia do Núcleo de Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Em abril de 2019 foi realizada uma nova coleta, sendo uma amostra retirada da saída do FBAS e outra do biofilme no interior do reator. Para a coleta do biofilme foi inserida uma mangueira entre o material suporte e a amostra foi succionada. Ambas foram acondicionadas em garrafas plásticas de 500 mL e levadas ao laboratório para análise.

Ocorrência de bactérias nitrificantes

Para a detecção das bactérias nitrificantes se utilizou o método dos tubos múltiplos e para quantificação, a obtenção do Número Mais Provável (NMP) de Alexander (2005). Foi realizada uma diluição seriada com o uso de pipeta automática, retirando-se 1,0 mL do frasco contendo a amostra e transferindo-a para a água de diluição. Diluíram-se as amostras até dez vezes. Em seguida, transferiu-se uma alíquota de 1,0 mL da amostra diluída para cada série de cinco tubos por diluição (quintuplicata), contendo o meio de cultura específico para crescimento de bactérias nitrificantes diferenciando os meios específicos para as oxidadoras de amônia e as oxidadoras de nitrito. Os tubos de ensaio contendo o meio de cultura para nitrificantes foram mantidos em estufa a 28°C durante 21 dias. Logo após foram feitas as leituras aplicando-se três gotas do reagente de Griess-Ilosvay.

Os meios utilizados são específicos para bactérias que oxidam amônia (*Nitrosomonas*) e nitrito (*Nitrobacter*), porém possibilita o desenvolvimento de outros gêneros bacterianos desse grupo. A presença de nitrito era verificada quando ocorria o aparecimento de uma cor vermelho-púrpura nos tubos com meio de cultura específico para oxidadoras de amônia, e o teste era considerado positivo. Ao se observar a ocorrência de nitrito nos tubos, pode-se inferir que este foi produzido pelas bactérias oxidadoras de amônia

que se desenvolveram no meio e associar aos resultados positivos, a presença dessas bactérias.

Nos tubos com meio de cultura específico para oxidadoras de nitrito, após a aplicação das três gotas do reagente, a leitura das amostras obedeceu a seguinte regra: era positiva para a amostra que não apresentar cor vermelho púrpura, pois isso indica a ausência de nitrito, podendo-se inferir que este foi convertido em nitrato pelas bactérias oxidadoras de nitrito.

Determinação do NMP

Após a leitura os resultados foram apresentados como positivos ou negativos para cada série de tubos e diluições de cada amostra. O valor de NMP foi obtido a partir da tabela do Standard Methods for Analysis of Water and Wastewater (APHA et al., 2005) de acordo com o número de positivos verificados. O índice NMP inclui limites de confiança de 95% para cada valor determinado. O índice do NMP é o número que na tabela do NMP corresponde a uma combinação de tubos selecionados nas três maiores diluições em que se verifiquem resultados positivos, formando assim um código de três dígitos.

Análises físico-químicas

As análises químicas de nitrito e nitrato foram realizadas a partir das amostras retiradas da saída do FBAS, e na entrada e saída para o nitrogênio total Kjeldahl (NTK). O NTK foi analisado pelo método micro-Kjeldahl, o nitrito por colorimetria pelo método da sulfanilamida, o nitrato por colorimetria pelo método salicilato e amônia de acordo com o descrito no Standard Methods (APHA et al., 2005). O pH foi medido em peagâmetro de bancada e a temperatura diretamente a partir da coleta na saída por um termômetro digital. A eficiência de remoção do sistema para o NTK foi obtida a partir das concentrações encontradas na entrada e saída do FBAS de acordo com a Equação 3.

$$E (\%) = \frac{C_i - C_f}{C_f} \times 100 \quad (3)$$

Em que:

E – Eficiência (%)

C_i – Concentração inicial (mgL⁻¹)

C_f – Concentração final (mgL⁻¹)

Isolamento de bactérias nitrificantes

Para se observar as características das bactérias que se desenvolveram nos tubos com o meio de cultura, procedeu-se com a técnica de isolamento. A partir das amostras obtidas em abril de 2019 do biofilme e da saída do FBAS, foi realizada a técnica do dos tubos múltiplos e obtido o NMP. Após o tempo de incubação e antes da leitura com a aplicação dos reagentes colorimétricos, foram retiradas 0,3mL de cada tubo da primeira série de tubos correspondente a primeira diluição, sendo transferidas todas as alíquotas para um novo tubo com 1,5 mL de meio de cultura estéril, e estes foram levados à estufa a 28°C.

Após sete dias, as amostras foram transferidas para placas de Petri contendo meio sólido composto por Ágar nutriente e meio de cultura (proporção de 0,018g para 100mL) e foram incubadas em estufa a 28°C por cerca de 30 dias. Os meios de cultura utilizados foram os mesmos dos tubos e, portanto podem ser

considerados específicos para as oxidadoras de amônia e de nitrito. As placas retiradas da estufa foram então observadas a olho nu e em microscópio óptico após realizar-se a técnica de coloração de GRAM.

Microscopia Eletrônica de Varredura

A amostra da biomassa, coletada no biofiltro da ETE do Parque e cultivada em meio de cultura líquido nitrito carbonato para BON, foi encaminhada para o Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME) do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, onde foi tratada com uma solução fixadora Karnovsky modificada (Glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2, CaCl₂ 0,001M) por um período de 24 horas. Foi preparada uma lâmina de vidro revestida com uma película de poli-L-lisina e em seguida a amostra foi pipetada na superfície da mesma. Posteriormente, seguiu-se a lavagem em tampão cacodilato 0,05M, pH 7,2 (duas vezes, cada lavagem com duração de 10 minutos) e desidratação em etanol (25%, 50%, 75%, 90% e 100%, 10 minutos cada). Posteriormente a amostra devidamente identificada foi levada para secagem no aparelho de Ponto Crítico (Bal-Tec). A amostra foi então montada em um stub e levada ao aparelho evaporador de ouro (Sputtering, Bal-Tec) para o banho de ouro e por fim analisada no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) LEO EVO 40 XVP.

Matriz de Correlação de Pearson

O grau de associação entre variáveis pode ser avaliado através da correlação, visando identificar padrões entre a variabilidade de ambas. O coeficiente de correlação de Pearson exprime o grau de associação através da razão da covariância pelo produto dos desvios-padrão de duas variáveis (SCHULTZ et al., 1992). Para as correlações calculadas, o valor limítrofe de 70% foi considerado como representativo, somente se a significância estatística for estabelecida ($p < 0,05$). A matriz de correlação foi calculada a partir dos algoritmos dos pacotes Openair (CARLAW et al., 2012) e MASS (VENABLES et al., 2002), dentro do ambiente de programação R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011).

RESULTADOS

Análises físico-químicas e a relação com a densidade de bactérias

As coletas realizadas na saída do FBAS geraram dados de concentração e a partir destes plotou-se gráficos representando a variação quantitativa destes dados (Figura 1 e 2). O valor médio de pH e temperatura foram 7,45 e 25°C respectivamente. As distribuições amostrais das concentrações obtidas estão de acordo com a Tabela 1. Para o NTK, considerou-se a quantificação de amônia e nitrogênio orgânico contido nas amostras, sendo o NH_x a representação da soma de NH₃ e NH₄⁺, porém é correto afirmar que essa quantificação deve ser considerada para uma predominância de amônia ionizada (NH₄⁺) no meio e isto ocorre pois, durante as análises, uma grande parte de NH₃ é volatilizada e essa quantificação pode representar uma maior concentração de NH₄⁺ na amostra e ao fato de que quando os compostos nitrogenados se encontram

em meio aquoso, ocorre a formação de íons amônio.

Tabela 1: Concentração das variáveis analisadas da saída do FBAS.

Data	pH	Temperatura	NHx	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	NTK
			mg L ⁻¹			
17/9	7.9	17	56.17	0.00508	0.07	23.48
15/10	6.95	26	16.18	0.11249	1.05	11.42
29/10	7.27	25	30.46	0.06561	3.22	19.04
5/11	7.49	23	6.66	0.07126	5.61	55.22
12/11	7.37	26	18.09	0.08359	8.00	42.84
19/11	7.69	26	28.56	0.01732	0.16	47.60
26/11	7.73	26	54.26	0.02909	1.59	2.80
3/12	7.4	26	27.61	0.02485	5.61	19.60
10/12	7.21	26	5.71	0.04443	1.95	18.20

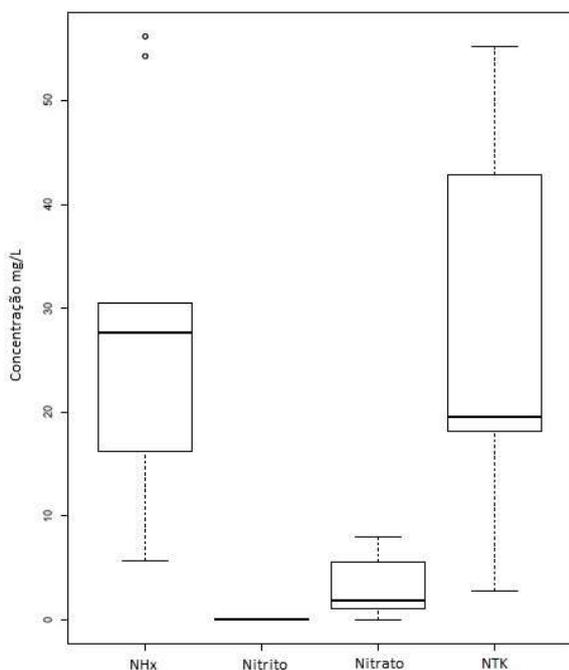


Figura 1: Gráfico boxplot das variáveis analisadas.

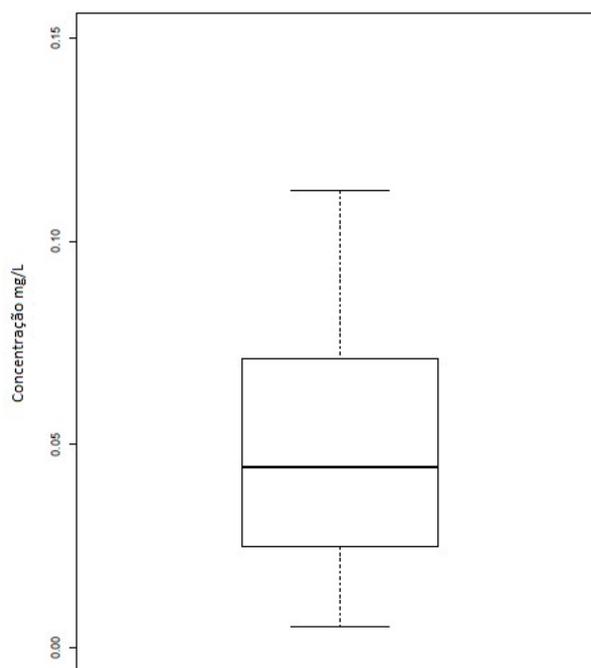


Figura 2: Gráfico boxplot apenas do nitrito.

A partir dos dados obtidos, buscou-se uma relação entre estes e a densidade de bactérias no sistema, para isso, obteve-se o NMP/100 mL das bactérias oxidadoras de amônia (BOA) e oxidadoras de nitrito (BON). Os resultados estão apresentados na Tabela 2. A matriz de correlação obtida está na Figura 3. A obtenção do p-valor está descrita na Tabela 3.

Tabela 2: Densidade de bactérias.

NMP/100ml		
DATA COLETA	BOA	BON
25/10	1,40.10 ⁰⁸	3,80.10 ⁰⁶
22/11	1,70.10 ⁰⁵	3,40.10 ⁰⁶

Tabela 3: p-valor obtido para as variáveis correlacionadas.

Variável	Se relaciona com	p-valor
NTK	Temperatura	0,77
	NO ₂ ⁻	0,89
	NO ₃ ⁻	0,29
	NHx	0,24
	pH	0,61
pH	Temperatura	0,11
	NO ₂ ⁻	0,01*

	NO ₃ ⁻	0,52
	NHx	0,03*
NHx	Temperatura	0,21
	NO ₂ ⁻	0,08
	NO ₃ ⁻	0,23
NO ₃ ⁻	Temperatura	0,47
	NO ₂ ⁻	0,31
NO ₂ ⁻	Temperatura	0,30

*valores considerados estatisticamente significativos.

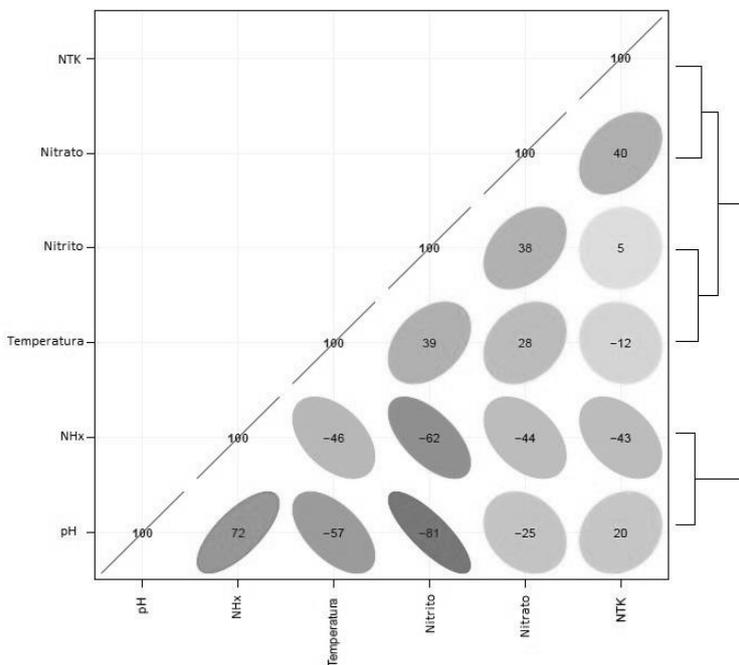


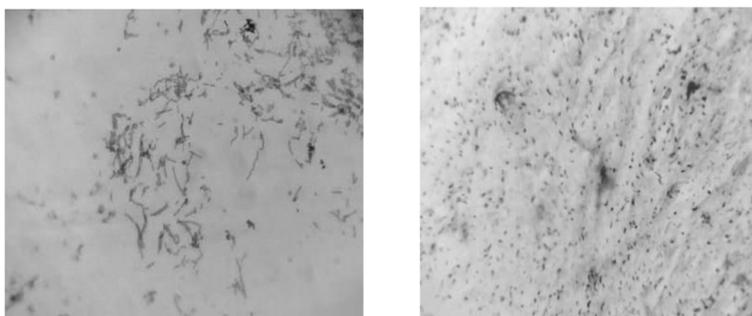
Figura 3: A matriz da correlação

Isolamento de bactérias nitrificantes

A partir das amostras coletadas em abril de 2019, foi obtido o NMP/100 mL que está descrito na Tabela 4. Após a técnica de coloração de GRAM as amostras foram observadas em microscópio óptico, e os resultados estão apresentados na Figura 4. Amostras do biofilme foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) e estão na Figura 5.

Tabela 4: Densidade de bactérias nitrificantes na saída o FBAS e no biofilme.

NMP/100ml			
DATA DA COLETA		BOA	BON
15/04/2019	Saída do FBAS	3,60.10 ⁰⁸	2,00.10 ⁰⁷
	Biofilme	4,90.10 ⁰³	6,10.10 ⁰⁹



(a) Bactérias oxidadoras de amônia (BOA) e (b) Bactérias oxidadoras de Nitrito (BON).

Figura 4: Bactérias observadas em microscópio óptico.

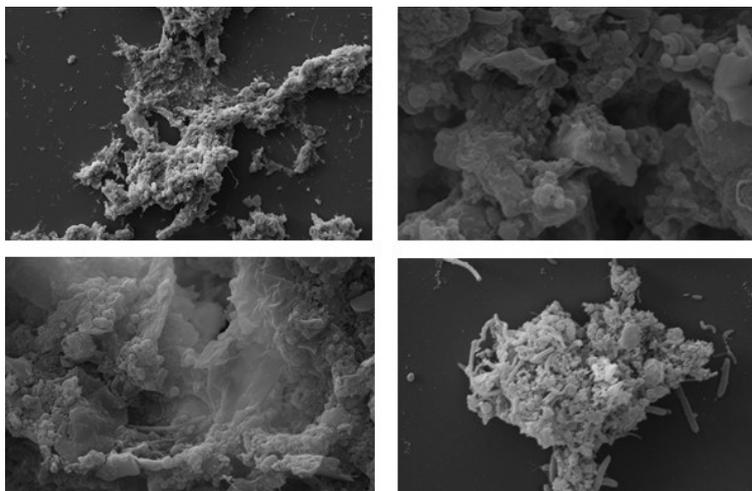


Figura 6: Biofilme observado em Microscópio Eletrônico de Varredura.

DISCUSSÃO

Pode-se observar a partir do boxplot das variáveis físico-químicas que a distribuição dos valores obtidos de concentração de NH_x no sistema indica um maior agrupamento dos dados abaixo da mediana, ou seja, no segundo quartil, e alguns outliers. Esta variação da distribuição dos dados representa uma flutuação da concentração de NH_x no sistema e que esta concentração tende a diminuir dependendo da conversão de NH_x em nitrito. A concentração de nitrito (Figura 2) muito baixa e pouco variável pode significar que não há acúmulo de nitrito no sistema, e que o NH_x foi convertido em nitrito e rapidamente oxidado a nitrato. Essa conversão está ligada ao desenvolvimento das bactérias que utilizam esses substratos para seu crescimento.

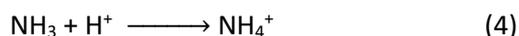
De acordo com Ferreira (2000), o crescimento das *Nitrosomonas* é limitado pela concentração de NH_x , enquanto que o crescimento das *Nitrobacter* é limitado pela concentração de nitrito, e isto está de acordo com os valores de NMP/100 mL das bactérias que demonstraram uma maior densidade de BOA em relação as BON na primeira coleta. Em uma segunda análise a densidade de BOA demonstrou ser menor que a de BON, podendo estar ligado às variações das concentrações de NH_x e nitrito no sistema que são limitantes para o crescimento dessas bactérias.

Alguns fatores tem influência sobre o crescimento dos microrganismos, e dentre eles a temperatura e pH. Estudos apontam para uma faixa de pH ideal para a nitrificação entre 7,2 e 8,6 (JORDÃO et al., 2005), e para a temperatura, uma forte dependência até 20°C, podendo afetar a taxa de crescimento das bactérias em um aumento de até 13% por cada grau centígrado de aumento de temperatura (GUERRA, 2017). De acordo com a temperatura e pH medidas do FBAS, há favorecimento da nitrificação e portanto consumo de NH_x e nitrito pelas *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* respectivamente.

A maior amplitude gráfica apresentada é do NTK que deve ser avaliado em termos da amonificação. Na amonificação, as proteínas de células mortas e produtos residuais já decompostos por microrganismos e transformados em aminoácidos são, convertidos em NH_x (TORTORA et al., 2005). A partir da Figura 1, pode-se observar que em relação ao NH_x , o NTK possui mediana inferior, o que pode representar que, na quantificação do NTK, as proteínas ou aminoácidos tem sido quantificados em maior concentração do que NH_3 . Pode-se avaliar a eficiência de remoção de nitrogênio no sistema a partir da concentração obtida na

entrada e na saída no FBAS. A eficiência média de remoção no período de monitoramento foi de 35%. O decaimento na concentração total de nitrogênio no FBAS está ligado ao metabolismo das bactérias, pois a redução de nitrogênio no meio indica que este foi utilizado pelos microrganismos para seu crescimento celular.

A partir do dendograma da Figura 3, pode-se identificar a relação entre as variáveis, e esta relação demonstrou que o pH apresenta uma correlação positiva de 72% com o NHx, significando que o aumento de pH gera um aumento da concentração de NHx no meio. É importante destacar as formas em que o NHx se apresenta, podendo estar presente na forma de íon amônio (NH_4^+), ou não ionizada (NH_3), sendo o equilíbrio dinâmico representado pela Equação 4.



De acordo com Von Sperling (2014), a distribuição relativa de NHx assume as seguintes formas dependendo do pH. Em $\text{pH} < 8$ praticamente todo NHx está na forma ionizada, em $\text{pH} = 9,5$ aproximadamente 50% está na forma livre e 50% na forma ionizada, e para $\text{pH} > 11$, praticamente toda o NHx está na forma de NH_3 . Neste caso, a correlação entre o pH e a NHx tem caráter quantitativo e não qualitativo pois não leva em consideração as formas de NHx no meio. Por outro lado é possível destacar a dependência entre a variável NHx e o valor de pH. Na etapa de monitoramento do efluente na saída do FBAS, o pH médio obtido foi de 7,45, ou seja, há indicativo de que as formas predominantes de NHx no efluente estejam na forma ionizada.

Outra associação linear que pode ser destacada é entre o pH e a concentração de nitrito que apresentou uma correlação de 81%, porém neste caso essa correlação é negativa, o que indica que um aumento da concentração de nitrito no reator está ligado a diminuição do pH no sistema. Segundo Ferreira (2000), quando o pH é baixo há um declínio na taxa de oxidação da amônia, tendo o pH um efeito inibitório. Esse declínio também é observado em valores de pH acima de 8, sendo esta uma condição limitante para o desenvolvimento dos microrganismos, justificando essa correlação. A taxa máxima de oxidação da amônia se dá em pH neutro.

Durante a nitrificação, a formação de nitrito está ligada à concentração de hidróxido de amônio no meio, e este é definido pela disponibilidade de NH_4^+ . No presente trabalho, as condições do meio são favoráveis à oxidação de NHx, pois nessa faixa de pH a taxa de nitrificação é máxima. Já a partir das amostras coletadas em abril de 2019, e da obtenção do NMP/100mL se pode inferir que a densidade de BOA e BON estiveram próximas aos valores obtidos no monitoramento anterior para a saída do FBAS indicando que o sistema mantém as condições favoráveis ao crescimento dos microrganismos nitrificantes. Para as amostras referentes ao biofilme, o NMP obtido demonstra uma menor densidade de BOA e uma alta densidade de BON, havendo predominância de bactérias do gênero *Nitrobacter* no biofilme, e que neste ponto esteja ocorrendo uma maior taxa de nitratação, ou seja, a conversão de nitrito em nitrato.

Após o cultivo em meio sólido foi realizada a observação das colônias formadas nas placas de Petri que se deu à olho nu e em microscópio óptico. Para as placas que continham meio seletivo para bactérias oxidadoras de amônia, observou-se a formação de colônias com uma tipologia branca leitosa. Para as placas com meio seletivo para bactérias oxidadoras de nitrito, as colônias formadas apresentaram-se incolores.

As duas amostras apresentaram coloração rosa ao serem observadas em microscópio, indicando que os dois grupos de bactérias são gram-negativas. Bactérias do gênero *Nitrosomonas* são gram-negativas e tem morfologia em forma de bastonetes como observado na Figura 4 (a), indicando a presença desse gênero no meio de cultivo. Bactérias do gênero *Nitrobacter* apresentam morfologia em forma de bastonetes, podendo ocorrer em formato de pêra ou serem pleomórficas (podendo ocorrer variação de formato ou tamanho da célula, e é um fenômeno observado em resposta às condições ambientais). Sendo o meio utilizado específico para oxidadoras de nitrito, pode-se inferir que a ocorrência das colônias é representada em sua maioria por organismos do gênero *Nitrobacter*, como observado na Figura 4 (b).

Nas imagens obtidas por MEV pode-se observar a estrutura do biofilme microbiano que é composto pelas células dos microrganismos e de compostos inorgânicos que conferem o aspecto de adesão entre as células. Em todas as imagens é possível observar a ocorrência de bactérias em formato de bastonetes e cocos, e estas se encontram aderidas à massa do biofilme (lodo). As morfologias observadas no MEV e em microscópio óptico demonstram que estes microrganismos são do gênero *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*, e corroboram para a análise do NMP que identificou estes gêneros no biofilme. Ao se verificar que estes microrganismos estão ocorrendo no biofilme, pode-se dizer que nesta parte sólida do reator está ocorrendo o processo de nitrificação.

CONCLUSÕES

Sabe-se que a microbiologia tem sido empregada em diversos processos industriais e tecnológicos, e cada vez mais há a necessidade de se entender as relações entre os microrganismos e o ambiente e as variáveis que influenciam seu desenvolvimento e ação. Os microrganismos são utilizados em grande escala em processos já consolidados, como na produção de produtos farmacêuticos, durante processos industriais, no tratamento de efluentes, na biorremediação de ambientes contaminados e na extração de minerais, como por exemplo, a extração de cobre por lixiviação quando são utilizadas bactérias dos gêneros *Thiobacillus ferrooxidans* na recuperação de categorias tidas como não-lucrativas de minérios de cobre (TORTORA et al., 2005).

Um processo que está em fase de investigação, é o potencial de degradação de hormônios presentes nas águas residuárias por bactérias. Spohr et al. (2014), obtiveram uma taxa média de degradação de hormônios estrógenos de 82%, reduzindo sua concentração a partir de gêneros de bactérias como as *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus thuringiensis*. Teixeira (2016) avaliou o potencial de remoção de hormônios como estrona, β -estradiol, estriol e α -etinilestradiol por microrganismos que realizam a remoção de nitrogênio em uma estação de tratamento de efluentes, alcançando resultados não satisfatórios, porém se avaliou uma relação entre a remoção de NTK e de hormônios.

No presente estudo em que se avaliou a remoção de compostos nitrogenados, as análises físico-químicas do efluente do FBAS demonstraram que o sistema garante a manutenção dos microrganismos e que estes são dependentes das condições variáveis do meio. A densidade de bactérias demonstrou que no reator avaliado, há ocorrência da nitrificação e que esse processo ocorre tanto no efluente quanto no

biofilme, e este tem maior favorecimento da nitratação. Os parâmetros avaliados possuem uma correlação e entre eles o pH pode ser considerado como o fator limitante para a nitrificação, e isto se relaciona ao crescimento das bactérias. A ocorrência dos microrganismos pode ser verificada tanto no efluente, quanto aderidas ao biofilme e que os gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* podem ser identificados a partir do cultivo em meio sólido e observadas nos microscópios óptico e eletrônico de varredura.

Ao se avaliar a aplicação das bactérias nitrificantes no tratamento de esgoto de canil, identificou-se potencial biotecnológico desses microrganismos na remoção de outros componentes presentes no efluente, com hormônios e moléculas inorgânicas. Sendo assim, devem ser realizados estudos para se avaliar esse potencial de remoção e quais fatores são intervenientes em cada processo.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, M.. Most probable number method for microbial populations. In: BLACK, C. A. **Methods of soil analysis, part 2: Chemical and microbiological properties**. Madison: American Society of Agronomy, 1982. p.1467-1472.
- APHA; AWWA; WEF. American Public Health Association; American Water Works Association; Water Environment Federation. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21 ed. Washington: APHA, 2005.
- AQUINO, S. F.; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. L.. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão de literatura. **Eng. Sanit Ambient.**, v.18, n.3, p.187-204, 2013.
- BRASIL. **Lei n.9.433/1997**. Política Nacional de Recursos Hídricos. Brasília: DOU, 1997.
- CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução n.357, 17 de Março de 2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece condições e padrões de lançamento de efluente, e dá outras providências. Brasília: DOU, 2005.
- CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução n.430, 13 de Maio de 2011**. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente. Brasília: DOU, 2011.
- CADONÁ, E. A.; LOURENZI, D. R.; SOUZA, E. L.; RAMPINELLI, E. C.; SANTOS, M. L.; SETE, P. B.; SOARES, C. R. F. S.. Contaminação por nitrogênio e fósforo de águas destinadas ao consumo humano em região com intensa atividade agrícola. **Geociências**, São Paulo, v.37, n.4, p.883-891, 2018.
- CARDOSO, G. G.; GARCIA, G.; SANTOS, O. A. M. Da escassez ao estresse do planeta: um século de mudanças no ciclo do nitrogênio. **Química Nova**, Araraquara, v.36, n.9, p.1468-1476, 2013.
- CARLAW, D. C.; ROPKINS, K.. Openair: An R package for air quality data analysis. **Environmental Modelling & Software**, v.27-28, p.52-61, 2012.
DOI: <http://doi.org.10.1016/j.envsoft.2011.09.008>
- ESPER, L. M. R.. Formação de Biofilmes Microbianos. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA APLICADA, 5. **Anais**. Niterói: Universidade Federal Fluminense, 2011.
- ESTEVES, F. A.. **Fundamentos de Limnologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1998.
- FLECK, L.; EYNG, E.. Remoção biológica de nitrogênio em efluentes líquidos: uma revisão. **Revista Eixo**, Brasília, v.4, n.2, 2015.
- FREITAS, I. C. V.; RODRIGUES, M. B.. Fixação biológica do nitrogênio na cultura do milho. **Agropecuária Técnica**, Areia, v.31, n.2, 2010.
- FERREIRA, E. S.. Cinética química e fundamentos dos processos de nitrificação e desnitrificação biológica. In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 27. **Anais**. Porto Alegre: ABES, 2000.
- GALEMBECK, E.; COSTA, C.. A evolução da composição da atmosfera terrestre e das formas de vida que habitam a Terra. **Química Nova Esc.**, v.38, n.4, p.318-323, 2016.
- GUAIMACUTO, P. J. L. Z, J. L. F.. El proceso Anammox. **Geomias**, v.42, n.63, 2014.
- GUERRA, T. F. M. F.. **Determinação das constantes cinéticas de nitrificação e nitratação em função da temperatura**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Recursos Hídricos e Sanitária) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2017.
- JARVIE, H. P.; NEAL, C.; WITHERS, P. J. A.. Sewage-effluent phosphorus: A greater risk to river eutrophication than agricultural phosphorus?. **Science of the Total Environment**, v.360, p.246-253, 2006.
- JORDÃO, E. P.; PESSOA, C. A.. **Tratamento de Esgotos Domésticos**. 4 ed. Rio de Janeiro: ABES, 2005.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J.. **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- MARTINELLI, L. A.. Os caminhos do nitrogênio: do fertilizante ao poluente. In: **N2007 Conference**: CT5 – Contributed talks

on the nitrogen fertilizer industry and the future. Costa do Sauipe, 2007.

PADRÃO, D. O.; SOBRAL, L. G. S.; OLIVEIRA, D. M.. Bio-extração de níquel a partir de rejeito gerado durante o processamento de minério primário. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 20. **Anais. CETEM**, 2012.

QUEIROZ, C. A.; ALVIM, L. B.; SABARÁ, M. G.; LEÃO, M. M. D.; AMORIM, C. C.. Reestruturação na forma do tratamento de efluentes têxteis: uma proposta embasada em fundamentos teóricos. **Gestão e Produção**, São Carlos, v.26, n.1, 2019.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Viena: R Foundation for Statistical Computing V, 2011.

RODRIGUES D. F.; VIEIRA, F. C.; RODRIGUES, M. E. F.. Metahemoglobinemia: Etiopatogenia e quadro clínico. **Revista de Pediatria SOPERJ**, v.12, n.1, p.8-11, 2011.

SCHULTZ, D. P.; SCHULTZ, S. E.. **História da psicologia moderna**. 16 ed. São Paulo: Cultrix, 1992.

SOUZA, A. R.. **Avaliação da eficiência do sistema de tratamento de efluentes do canil Parque Francisco de Assis em Lavras/MG**. Dissertação (Mestrado em Recursos Hídricos em Sistemas Agrícolas) – Universidade de Federal de Lavras, Lavras, 2015.

SOUZA, J. S.; PEDROSA, P.; GATTS, P. V.; GRAVINA, G. A.. Aplicação das concentrações e proporções de nutrientes do diagnóstico da eutrofização. **Vértices**. Campos dos Goytacazes, v.16, n.1, p.199-218, 2014.

SPOHR, D. L.; CIRIO, E.; PIZZOLATO, T. M.; RUSCHEL, C. K.. Utilização de microrganismos na degradação de hormônios estrógenos. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v.15, n.24, p.105-212, 2014.

TEIXEIRA, R. B.. **Estudo da presença e remoção de hormônios estrogênicos em estação de tratamento de esgoto por lodos ativados**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial na área de microbiologia aplicada) – Universidade de São Paulo, Lorena, 2016.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L.. **Microbiologia**. 6 ed. ARTMED, 2000.

VENABLES, W. N.; RIPLEY, B. D.. **Modern Applied Statistics with S**. 4 ed. Springer, 2002.

VON SPERLING, M.. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 4 ed. Belo Horizonte: UFMG, 2014.

WIEGAND, M. C.; PIEDRA, J. I. G.; ARAÚJO, J. C.. Vulnerability towards eutrophication of two tropical lakes in both humid (Cuba) and semiarid (Brazil) climates. **Eng Sanit Ambient**. v.21, n.2, p.415-424, 2016. DOI: <http://doi.org.10.1590/S1413-41522016139527>

A CBPC – Companhia Brasileira de Produção Científica (CNPJ: 11.221.422/0001-03) detém os direitos materiais desta publicação. Os direitos referem-se à publicação do trabalho em qualquer parte do mundo, incluindo os direitos às renovações, expansões e disseminações da contribuição, bem como outros direitos subsidiários. Todos os trabalhos publicados eletronicamente poderão posteriormente ser publicados em coletâneas impressas sob coordenação da **Sustenere Publishing**, da Companhia Brasileira de Produção Científica e seus parceiros autorizados. Os (as) autores (as) preservam os direitos autorais, mas não têm permissão para a publicação da contribuição em outro meio, impresso ou digital, em português ou em tradução.