



II-213 – MONITORAMENTO DE BACTÉRIAS NITRIFICANTES E DESNITRIFICANTES EM REATOR AERÓBIO OPERADO EM BATELADA INTERMITENTE

Lilian Caetano Bueno ⁽¹⁾

Tecnólogo em Gerenciamento Ambiental pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* Campo Mourão. Discente no III Curso de Especialização em Gerenciamento e Auditoria Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* Campo Mourão.

Alberto Moncari Barbosa de Sá ⁽²⁾

Graduando no curso de Tecnologia em Gerenciamento Ambiental na Universidade Tecnológica Federal do Paraná *campus* Campo Mourão.

Karina Querne de Carvalho ⁽³⁾

Engenheira Civil pela Universidade Estadual de Maringá. Mestre em Hidráulica e Saneamento pela Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP). Doutora em Engenharia Hidráulica e Saneamento pela Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP). Docente da Coordenação de Ambiental do *campus* Campo Mourão da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Kátia Valéria Marques Cardoso Prates ⁽⁴⁾

Bióloga pela Universidade Federal de São Carlos. Mestre em Hidráulica e Saneamento pela Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP). Doutora em Ciências da Engenharia Ambiental pela Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP). Docente da Coordenação de Ambiental do *campus* Londrina da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Endereço ⁽¹⁾: Av. dos Pioneiros, 3131 – Londrina - PR - CEP: 86036-370 - Brasil - Tel: +55 (44) 3029-3226 - Fax: +55 (44) 3029-9727 - e-mail: secretaria@reymann.com.br.

RESUMO

A indústria de carnes vem crescendo proporcionalmente a população, e apesar de potencialmente poluidora, muitas vezes passa despercebida, uma vez que não manipula substâncias químicas altamente tóxicas. Entretanto, os resultados dos impactos ambientais podem ser notados principalmente nos corpos receptores, em virtude do lançamento dos efluentes oriundos dessa atividade. Esse trabalho teve por objetivo realizar o monitoramento microbiológico de bactérias nitrificantes e desnitrificantes em um reator operado com efluente de frigorífico em bateladas com aeração intermitente em um mesmo ciclo. Para a realização do experimento, foi construído um reator de plástico com capacidade de 10 litros, com paredes internas revestidas com espuma de poliuretano para reter e desenvolver a biomassa microbiana. O trabalho foi realizado em duas etapas distintas: Na primeira etapa, o reator foi operado com aeração prolongada para estabelecimento da biomassa microbiana; na segunda etapa, o reator foi operado em batelada sequencial com aeração de fluxo intermitente, sendo 2 ciclos de 24 horas e 2 ciclos de 36 horas, para estimar o número de bactérias nitrificantes e desnitrificantes e posteriormente realizar isolamento e manutenção dessas culturas. Os resultados obtidos durante os 30 dias de estabelecimento de biomassa microbiana indicaram aglomeração entre os microrganismos, predominância de bacilos durante o processo e de microrganismos semelhantes a filamentos durante a fase final do experimento. O isolamento e manutenção de culturas de bactérias nitrificantes e desnitrificantes em condições operacionais mostraram que a operação promoveu aumento do número de respostas positivas. Neste caso, foi observado que o ciclo de 36 horas foi o mais eficiente e na estimativa de crescimento de organismos de interesse, as bactérias oxidadoras de nitrito apresentaram maiores valores em todas as amostras.

PALAVRAS-CHAVE: Reator em Batelada Sequencial, Aeração Intermitente, Efluente de Frigorífico, Nitrificação, Desnitrificação.

INTRODUÇÃO

A indústria de carnes vem crescendo proporcionalmente a população, e apesar de potencialmente poluidora, muitas vezes passa despercebida, uma vez que não manipula substâncias químicas altamente tóxicas. Entretanto, os resultados dos impactos ambientais podem ser notados principalmente nos corpos receptores,



em virtude do lançamento dos efluentes oriundos dessa atividade (SILVEIRA, 1999; PACHECO e YAMANAKA, 2006; CNPC, 2007).

O rebanho bovino brasileiro é um dos maiores do mundo com cerca de 200 milhões de cabeças. Considerando que a população brasileira é de cerca de 185,2 milhões de habitantes, tem-se mais de um bovino por habitante, no Brasil. Os maiores produtores de bovinos estão nas regiões Centro-Oeste (34,24%), Sudeste (21,11%), Sul (15,27%), Nordeste (15,24%) e Norte com 14,15% do rebanho nacional (CNPIC, 2007).

Diversos resíduos são gerados no abate de bovinos, destacando-se efluentes líquidos que apresentam elevada concentração de nitrogênio. Esse elemento químico em elevadas concentrações nas águas tende a causar desequilíbrio e conseqüentemente crescimento exacerbado da vida aquática, ou seja, eutrofização (VAN HAANDEL & MARAIS, 1999). Concomitantemente surge a necessidade de removê-lo antes de lançá-lo nos corpos hídricos.

A remoção do nitrogênio pode ser realizada por via biológica, por meio da nitrificação e desnitrificação, que são processos realizados por microrganismos que atuam direta e indiretamente na estabilização da matéria orgânica em reatores aeróbios e anóxicos.

Tradicionalmente, os processos biológicos para remoção de nutrientes contemplam a nitrificação e a desnitrificação em reatores distintos. A nitrificação ocorre, em meio aeróbio, sob ação de bactérias autotróficas que oxidam o nitrogênio amoniacal a nitrito e posteriormente a nitrato; na desnitrificação, as bactérias heterotróficas reduzem as formas oxidadas do nitrogênio a nitrogênio gasoso, utilizando fonte externa de carbono em ambiente caracterizado pela ausência de oxigênio.

Recentemente, têm-se buscado a aplicação de processos conjugados, como os reatores em bateladas seqüenciais, que permitem a combinação dos tratamentos em um único reator, com operações seqüenciais ao longo do tempo.

O reator em batelada seqüencial (RBS) é um reator operado nas etapas seqüenciais de enchimento, reação, sedimentação dos sólidos, retirada do sobrenadante e repouso, que ocorrem no mesmo tanque (METCALF e EDDY, 1991).

Von Sperling (1997) salienta que o processo de um reator ocorre em etapas de tratamento, através do estabelecimento de ciclos de operações com durações definidas. A massa biológica permanece no reator durante todos os ciclos, e a duração usual de cada ciclo pode ser alterada em função das variações e das necessidades do tipo de tratamento e das características do efluente e da biomassa no sistema.

Para seleção do tipo de processo biológico a ser utilizado é necessária a compreensão das atividades bioquímicas desenvolvidas pelos microrganismos envolvidos nestes processos, uma vez que, dependendo do processo escolhido, este resultará em determinados produtos finais, benéficos ou não, para o processo de redução de nutrientes e/ou matéria orgânica.

Desta forma, é importante conhecer a comunidade microbiana, envolvida na estabilização da matéria orgânica, para auxiliar na busca pelo aprimoramento da eficiência de remoção, por exemplo, com a utilização de reatores aeróbios/anóxicos que possibilitam a formação de biofilmes.

Os biofilmes aprisionam os nutrientes necessários ao crescimento da população microbiana e dificultam o destacamento das células das superfícies em sistemas de fluxo corrente (MADIGAN *et al.*, 2004), aumentando a eficiência de remoção dos nutrientes no interior dos reatores.

Desta forma, é importante conhecer a comunidade microbiana envolvida na estabilização da matéria orgânica, para auxiliar na busca pelo aprimoramento da eficiência de remoção, por exemplo, com utilização de reatores aeróbios/anóxicos que possibilitam a formação de biofilmes (VON SPERLING *et al.*, 2001).

Dentro deste contexto, este artigo teve como objetivo principal o monitoramento microbiológico de bactérias nitrificantes e desnitrificantes em reator aeróbio em escala de bancada operado em bateladas com aeração intermitente em um mesmo ciclo tratando efluente de um frigorífico da cidade de Campo Mourão, Paraná.



MATERIAIS E MÉTODOS

Para realizar o monitoramento de bactérias nitrificantes e desnitrificantes, foi operado um reator aeróbio em batelada intermitente tratando efluente de um frigorífico na cidade de Campo Mourão, Paraná, que abate em média 1000 cabeças de bovinos por mês.

O sistema de tratamento dos efluentes gerados pelo frigorífico é composto por 5 lagoas, sendo 4 lagoas anaeróbias e uma lagoa facultativa. O efluente gerado no processo de abate é composto principalmente por sangue que compõe a “linha vermelha” (Figura 1a) e resíduos oriundos das demais etapas que compõem a “linha verde” (Figura 1b).



Figura 1. Ponto de mistura: a) linha vermelha; b) linha verde.

A primeira etapa do sistema de tratamento consiste de um decantador, no qual os sólidos mais grosseiros são removidos manualmente. Após passar pelo decantador, o efluente é conduzido até a primeira lagoa anaeróbia de tratamento que possui elevada carga de material flotante em sua superfície (Figura 2a).

O efluente da primeira lagoa anaeróbia é encaminhado para a segunda lagoa, da qual é recalcado para a terceira e quarta lagoas anaeróbias. Em seguida, o efluente tratado pelas lagoas anaeróbias é encaminhado para a lagoa facultativa, e desta é lançado no Rio Córrego dos Papagaios.



Figura 2. Vista da primeira lagoa do sistema de tratamento de efluente (a), e vista parcial das unidades que compõem o sistema de tratamento de efluentes do Frigorífico.

O reator aeróbio em batelada sequencial usado no trabalho foi montado com um recipiente de plástico de volume total de 10 litros, com paredes internas revestidas por uma camada de espuma de poliuretano com aproximadamente 0,5 cm de espessura para reter e desenvolver a biomassa microbiana (Figura 3a e Figura 3b). O sistema de aeriação era composto por três aeradores do tipo aquário para promover difusão do ar. Os aeradores eram conectados a pedras porosas para promover geração de bolhas.



Figura 3. Vista lateral do reator (a); detalhe da espuma de poliuretano (b).

Para realização do experimento, foi coletado efluente da quarta lagoa do sistema de tratamento de efluentes do frigorífico. O efluente foi coletado e armazenado em tambores plásticos com capacidade de 20 litros. Após a coleta, o efluente era levado para as dependências dos laboratórios de Saneamento e de Microbiologia do *campus* Campo Mourão da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

O trabalho foi realizado em duas etapas distintas. Na primeira etapa, o reator foi operado com sistema de aeração prolongada para estabelecimento de biomassa microbiana durante período de 30 dias; na segunda etapa, o reator foi operado com batelada seqüencial com aeração de fluxo intermitente.

Foram realizados 2 ciclos operacionais de 24 horas e 2 ciclos de 36 horas para realização de isolamento e manutenção de bactérias nitrificantes e desnitrificantes e avaliação da estimativa de organismos de interesse, de acordo com métodos descritos por Mendonça (2002).

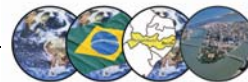
ESTABELECIMENTO DA BIOMASSA MICROBIANA

O estabelecimento da biomassa microbiana foi feito em período de 30 dias e a estimativa de contagem de bactérias foi realizada de acordo com os métodos descritos por Mendonça (2002). Para acompanhamento do estabelecimento da biomassa, espumas de poliuretano (2 x 2 x 0,5 cm) foram recortadas e inseridas no reator para avaliação do estabelecimento da biomassa microbiana.

O crescimento microbiano era avaliado por meio de realização de análises de contagem em placa e microscópica em sete amostras coletadas semanalmente. As amostras coletadas eram inseridas em tubos de ensaio esterilizados contendo 9 mL de água destilada para diluição em série (10^1 a 10^7). Posteriormente, era realizado plaqueamento utilizando o meio de cultura PCA (*Plate Count Agar*). Após a contagem das colônias, observou-se os organismos predominantes em microscópio óptico comum sob preparação à fresco e com coloração de Gram segundo metodologia reportada por Jenkins *et al.* (1993).

AValiação DA ESTIMATIVA DE ORGANISMOS DE INTERESSE

Os ciclos operacionais do reator eram compostos pelas etapas de: alimentação do reator, aeração (ciclo de 24 ou 36 horas), ausência de oxigênio (ambiente anóxico, ciclo de 24 ou 36 horas) e descarte do efluente tratado. As coletas de amostras eram feitas em cada uma dessas etapas e testes de determinação de nitrito e nitrato remanescentes foram realizados após incubação de 15, 30 e 15 dias, respectivamente, para verificar a presença de bactérias oxidadoras de amônia, oxidadoras de nitrito e desnitrificantes de acordo com metodologia adaptada de Mendonça (2002). As amostras também foram observadas por microscopia ótica comum à fresco e com coloração de Gram.



Nos ensaios de coloração de Gram, era feito isolamento e manutenção das bactérias nos tubos que apresentam presença de bactérias oxidadoras de amônia, oxidadoras de nitrito e desnitrificantes.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

ESTABELECIMENTO DA BIOMASSA MICROBIANA

Os resultados obtidos durante os 30 dias de estabelecimento de biomassa microbiana indicaram aglomeração entre os microrganismos e predominância de bacilos (Figura 4a e Figura 4b) durante o processo de fixação da biomassa na espuma e predomínio de microrganismos semelhantes a filamentos na fase final do experimento (do processo de estabelecimento da biomassa).

A contagem de bactérias heterotróficas da população microbiana presente na espuma de poliuretano (fixação da biomassa microbiana) não indicou variação significativa (amostra coletada no primeiro dia e após sete dias). Este resultado era esperado em função da fase de adaptação dos microrganismos ao novo sistema.

Na primeira semana de acompanhamento do estabelecimento da biomassa microbiana, foi observado predomínio de morfologias semelhantes a bacilos. Na segunda semana de fixação de biomassa, foi observada visualmente aglomeração entre os microrganismos e crescimento significativo das colônias microbianas (Figura 4c e Figura 4d). Foi possível notar o desenvolvimento de microrganismos com aspectos semelhantes a microrganismos filamentosos na terceira semana de acompanhamento (Figura 4e e Figura 4f).

Na última semana de estabelecimento da biomassa, foi verificado aumento do número de organismos em relação à semana anterior. Após realização das análises microscópicas, foi observado crescimento significativo das colônias de microrganismos aderidos à espuma de poliuretano ao longo do período de 30 dias de operação do reator em batelada seqüencial (Figura 4g e Figura 4h).

O reator foi operado com aeração contínua durante o período de fixação da biomassa microbiana, o que provavelmente favoreceu o crescimento dos organismos aeróbios filamentosos no final do processo. Segundo Jenkins *et al.* (2003), quando não ocorre a alternância de condições ambientais (anóxico e aeróbio), pode-se favorecer o crescimento de organismos filamentosos que são menos hábeis em tornar o substrato solúvel e estocar internamente nutrientes para posterior utilização durante períodos de escassez.

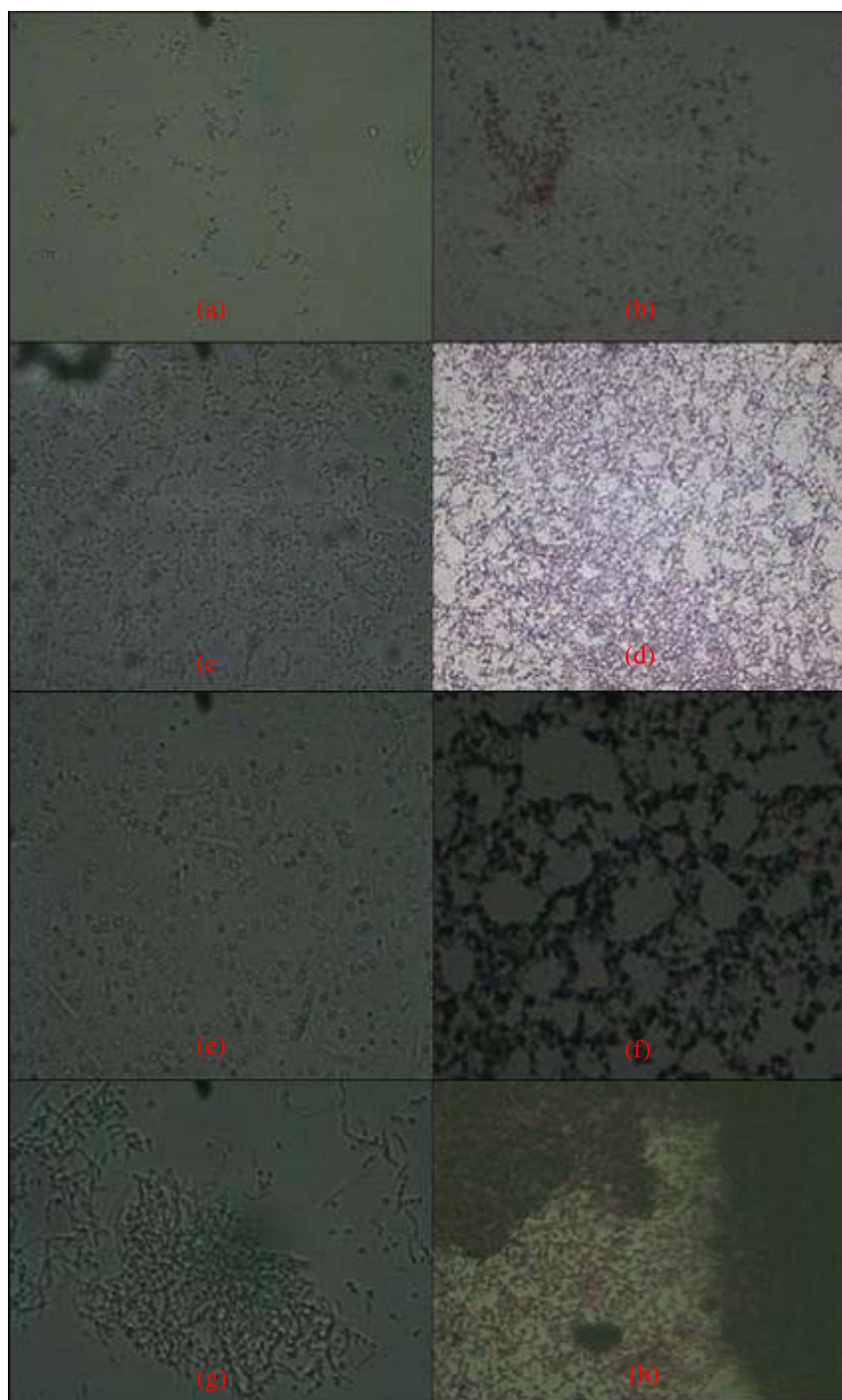


Figura 4. Microrganismos observados sob preparação à fresco, e coloração de Gram, com aumento de 1000x. (a) e (b) Morfologias semelhantes a bacilos após 7 dias de operação do reator; (c) e (d) segunda semana começando a formar aglomeração entre os microorganismos, e (e) e (f) terceira semana de imobilização dos microorganismos, apresentando microorganismos semelhantes a filamentos, e (g) e (h) após 30 dias de estabelecimento da biomassa microbiana, aglomeração entre colônias com predominância de microorganismos semelhantes a filamentosos.

AVALIAÇÃO DA ESTIMATIVA DE ORGANISMOS DE INTERESSE

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos na verificação do crescimento de organismos oxidadores de amônia, oxidadores de nitrito e desnitrificantes.



Tabela 1. Estimativa de crescimento de microrganismos de interesse.

Amostras	1º ciclo de 24 horas		2º ciclo de 24 horas		1º ciclo de 36 horas		2º ciclo de 36 horas	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Oxidadoras de amônia	10	10	14	06	18	02	19	01
Oxidadoras de nitrato	12	08	16	04	20	00	20	00
Desnitrificantes	08	12	12	08	20	00	19	01

No primeiro ciclo de 24 horas, foram obtidos 50% de tubos positivos e 50% de tubos negativos para as bactérias oxidadoras de amônia; 60% de tubos positivos e 40% de tubos negativos para as bactérias oxidadoras de nitrato e 40% de tubos positivos e 60% de tubos negativos para as bactérias desnitrificantes.

No segundo ciclo de 24 horas, foram verificados 65% de tubos positivos e 35% de tubos negativos para as bactérias oxidadoras de amônia, 75% de tubos positivos e 25% tubos de negativos para as bactérias oxidadoras de nitrato e 60% dos tubos positivos e 40% dos tubos negativos para as bactérias desnitrificantes. O aumento da porcentagem de microrganismos do primeiro para o segundo ciclo pode indicar que os microrganismos de interesse adaptaram-se melhor as condições de operação do reator (ciclo aeróbio-anóxico).

Na avaliação dos resultados referentes ao primeiro ciclo de 36 horas, na operação do primeiro ciclo, pode-se destacar valores significativos em relação ao crescimento de microrganismos de interesse, pois foi observado 90% de tubos positivos e 10% de tubos negativos para microrganismos oxidantes de amônia, 100% de tubos positivos para as bactérias oxidadoras de nitrato e 100% dos tubos positivos para as bactérias desnitrificantes (Tabela 3).

No segundo ciclo, 95%, 100% e 95% dos organismos oxidadores de amônia, oxidadoras de nitrato e desnitrificantes, respectivamente, foram positivos. Estes resultados indicam que o aumento de tempo de ciclo aeração - anóxico para 36 horas foi favorável ao desenvolvimento dos organismos diretamente envolvidos no metabolismo dos compostos nitrogenados.

Mendonça *et al.* (2001), Costa *et al.* (1999) e Araki *et al.* (1999) obtiveram populações de microrganismos nitrificantes oxidadores de amônia maiores em relação a microrganismos nitrificantes oxidadores de nitrito. Os resultados observados por estes autores foram diferentes dos resultados obtidos neste trabalho, pois o número de microrganismos oxidadores de nitrato foi maior em todas as condições de operação, indicando que não deve ter ocorrido acúmulo de nitrito.

Durante o monitoramento microbiológico, foram observados bacilos semelhantes a *Nitrosomonas* (oxidadoras de amônia) e *Nitrobacter* (oxidadoras de nitrito).

CONCLUSÕES

Com base no trabalho realizado, foi possível concluir que:

Os ensaios microbiológicos realizados durante os 30 dias de estabelecimento de biomassa microbiana indicaram crescimento e adaptação dos microorganismos ao meio em um primeiro momento e posteriormente aglomeração entre os microrganismos com predominância de bacilos durante o processo e microrganismos semelhantes a filamentos durante a fase final do experimento.

O isolamento e manutenção de culturas de bactérias nitrificantes e desnitrificantes em condições operacionais mostraram que a operação promoveu aumento do número de respostas positivas. O ciclo de 36 horas foi mais eficiente.

Na estimativa de crescimento, as bactérias oxidadoras de nitrato apresentaram maior número de tubos positivos em todos os ciclos de operação do reator.

Morfologias semelhantes a *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* foram observadas nas análises microscópicas realizadas com amostras das oxidadoras de amônia e oxidadores de nitrito.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARAKI, N., OHASHI, A., MACHDAR, I., HARADA, H. Behaviors of nitrifiers in a novel biofilm reactor employing hanging sponges-cubes as attachment site. *Water Science & Technology*, v.39, n.7, p.23-31. 1999.
2. CNPC - CONSELHO NACIONAL DA PECUÁRIA DE CORTE. Balanço da pecuária bovina de corte. Site corporativo. Disponível em <http://www.cnpc.org.br> acessado em julho de 2007.
3. COSTA, A.J.M.P., RIVEIRA, I.N.G., MORITA, D.M., ALÉM SOBRINHO, P., LIMA, C.A.P., VILLAS BÔAS, D.M. (1999). Acompanhamento microbiológico de Lodos Ativados Utilizados no Tratamento de Despejos Líquidos Sintéticos de Coqueria. In: XX Congresso Brasileiro de Microbiologia, Anais, Salvador, BA.
4. JENKINS, D., RICHARD, M.G., DAIGGER, G.T. (2003) Manual on the causes and control of activated sludge bulking, foaming and other solids separation problems. 3a ed. Boca Raton: Lewis Publishers, 190 p.
5. MADIGAN, M.T., MARTINKO, L.M., PARKER, J. (2004). Microbiologia de Brock. 10ª ed. São Paulo: Editora Pearson. 624 p.
6. MENDONÇA, L.C., OLIVEIRA, A.L., GIANOTTI, E.P., CAMPOS, J.R., BLUNDI, C.E. (2001). Caracterização Microbiológica de um Sistema de Remoção de Nitrogênio em Batelada. In: 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, ABES, Anais, João Pessoa, PB.
7. MENDONÇA, L.C. Microbiologia e cinética de sistemas de lodos ativados como pós-tratamento de efluente de reator anaeróbio de leito expandido. São Carlos, 2002. Tese de doutorado–Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2002.
8. METCALF e EDDY. (2003). Wastewater engineering: treatment, disposal and reuse. 4 a ed. New York: McGraw-Hill Inc. 1408 p.
9. PACHECO, J.W., YAMANAKA, H.T. (2006). Guia técnico ambiental de frigoríficos–industrialização de carnes bovina e suína (série P+L). São Paulo: CETESB. 85 p. Disponível em http://www.cetesb.sp.gov.br/Tecnologia/producao_limpa/documentos/frigorifico.pdf acessado em julho de 2008.
10. SILVEIRA, D.D. Modelo para seleção de sistemas de tratamento de efluentes de indústrias de carnes. Florianópolis, 1999. 269 p. Tese de Doutorado–Engenharia de Produção–Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1999.
11. VAN HAANDEL, A., MARAIS, G.V.R. (1999). O comportamento do sistema de lodo ativado: teoria e aplicações para projetos e operações. 1ª ed. Campina Grande: Epgraf. 472 p.
12. VON SPERLING, M. (1997). Lodos ativados. Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias. 1ª ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais. v. 4. 415 p.
13. VON SPERLING, M., VAN HAANDEL, A.C., JORDÃO, E.P., CAMPOS, J.R., CYBIS, L.F., AISSE, M.M., ALÉM SOBRINHO, P. (2001) Pós-tratamento de efluente de reatores anaeróbios por sistema de lodos ativados. In: CHERNICHARO, C.A.L., coord. Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios. Belo Horizonte: DESA. cap.5, p.279-331.