

## ESTUDO DA NITRIFICAÇÃO E DESNITRIFICAÇÃO HETEROTRÓFICA POR *ALCALIGENES DENITRIFICANS*

J. AZEREDO<sup>1</sup>, R. OLIVEIRA<sup>2</sup>

### RESUMO

Os processos mais comuns de eliminação biológica de compostos azotados, compreendem uma 1ª fase de nitrificação aeróbia, seguida de uma fase de desnitrificação anaeróbia. O presente trabalho teve como objectivo estudar a capacidade de nitrificação e desnitrificação heterotrófica simultânea do *Alcaligenes denitrificans*. Uma das vantagens deste microrganismo é crescer em meio orgânico simples, bastando-lhe o citrato como fonte de carbono. Os ensaios efectuados permitiram concluir que o *Alcaligenes denitrificans* consegue desnitrificar em condições não anaeróbias, mas com uma concentração residual de oxigénio baixa. Relativamente à capacidade nitrificante, esta só é possível se o meio for suplementado com iões nitrito e/ou nitrato. Os rendimentos de remoção simultânea de amónia e de nitrito e nitrato foram de cerca de 53%. O rendimento de desnitrificação atinge 60 a 70%, a que corresponde uma taxa de consumo total de azoto entre 90 a 97%.

**Palavras chave:** nitrificação heterotrófica, desnitrificação, *Alcaligenes denitrificans*.

### 1 - INTRODUÇÃO

O grande aumento das emissões de compostos azotados, bem como os efeitos nefastos que estes provocam na saúde humana e nos habitat naturais, tem levado a um crescente interesse na procura de soluções tendentes à eliminação destes compostos [1,2]. Existem processos físico-químicos que se destinam à remoção de compostos azotados de efluentes líquidos. Os processos físico-químicos são pouco específicos e têm baixos rendimentos relativamente aos processos biológicos [1].

---

1 - Estudante de Doutoramento, Universidade do Minho, Dep. de Engenharia Biológica, 4709 Braga

2 - Prof. Auxiliar, Universidade do Minho, Dep. de Engenharia Biológica, 4709 Braga codex. Tel: 053-604409; Fax: 053-604413; e-mail: roliveira@ci.uminho.pt.

A eliminação biológica utiliza bactérias nitrificantes que actuam em condições aeróbias, oxidando azoto amoniacal, nitrito e/ou nitrato e bactérias desnitrificantes que seguem um processo anaeróbio para reduzir o azoto oxidado a compostos gasosos. Estas formas de eliminação implicam sistemas de tratamento bastante complexos. No sentido de diminuir a complexidade destes sistemas de tratamento, têm sido estudadas novas alternativas, que passam pela utilização de microrganismos nitrificantes e desnitrificantes heterotróficos. *Thiosphaera pantotropha*, *Alcaligenes faecalis* e *Pseudomonas denitrificans*, são algumas das bactérias capazes de converter o azoto amoniacal em  $N_2$ . Estes microrganismos além de utilizarem compostos azotados no seu metabolismo, degradam também a matéria orgânica, o que constitui uma grande vantagem em relação aos nitrificantes tradicionais. [1,2,4].

A grande maioria dos nitrificantes heterotróficos habita no solo, sendo os grandes responsáveis pela acumulação de nitrato em solos cujas condições (baixo pH e baixa  $pO_2$ ) não permitem a existência de nitrificantes autotróficos [2]. Os nitrificantes heterotróficos mais activos são bactérias do género *Alcaligenes* isoladas do solo [6]. A capacidade nitrificante é atribuída às espécies *Alcaligenes faecalis* e *Alcaligenes denitrificans*. A nitrificação desempenhada por estas duas bactérias só é possível na presença de uma fonte de azoto (p.ex. amónia) e uma fonte de carbono (p. ex. citrato) [1,2,4,6].

Os produtos resultantes da oxidação de compostos azotados são:  $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$  e  $N_2O$  que se acumulam durante a fase exponencial de crescimento. A produção de compostos gasosos azotados por *Alcaligenes denitrificans* resulta de um processo de desnitrificação em que nitrito e nitrato são utilizados como aceitadores finais de electrões [1]. As taxas relativas de nitrificação e desnitrificação dependem da pressão de  $O_2$ . O nitrito compete com o oxigénio pela remoção de electrões, pelo que a  $pO_2$  é crítica na produção dos compostos gasosos azotados [2].

Este trabalho teve por objectivo o estudo da capacidade nitrificante e desnitrificante de *Alcaligenes denitrificans*.

## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

**Crescimento e manutenção de culturas:** *Alcaligenes denitrificans* ATCC15173, foi cedida pela Coleção Espanhola de Culturas. As células foram conservadas a 4°C em placa de agar inclinado com meio de extracto de carne.

**Fermentações batch:** as culturas Batch foram efectuadas em fermentadores de 2 l equipados com uma sonda de pH, uma camisa de aquecimento, um agitador magnético e uma sonda de oxigénio. O arejamento foi feito a partir de um difusor de ar mergulhado no fermentador. A temperatura foi fixada a 24°C por uma camisa de aquecimento. O controlo de pH foi efectuado automaticamente pela adição de HCl 0.1M quando o pH excedia 7.0.

**Meio de cultura:** *Alcaligenes denitrificans* cresceu a 24°C num meio de citrato mínimo, composto por 9.27 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.82 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.48 g/l citrato de tri-potássio di-hidratado, 0.0273 g/l de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0.0055 g/l FeSO<sub>4</sub>, 0.000909 g/l de MnCl<sub>2</sub>, 0.00545 g/l de CaCl<sub>2</sub> e 0.2 g/l de MgSO<sub>4</sub>. Este meio foi ainda suplementado com uma fonte de azoto, que variou em todos os ensaios (Tabela I).

Tabela I: Condições de operação dos fermentadores:

Fermentação n <sup>o</sup>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/l)	KNO <sub>3</sub> (g/l)	NaNO <sub>2</sub> (g/l)	Arejamento
1	0,96	-	-	abundante
2	0,42	-	-	nulo
3	-	0,76	-	nulo
4	-	-	0,75	nulo
5	-	0,60	0,40	nulo
6	0,45	0,37	0,16	nulo
7	0,30	0,37	0,20	abundante

**Monitorização do sistema:** O sistema foi monitorizado periodicamente, de modo a se obter um perfil de evolução de biomassa, amónia, nitrito e nitrato.

## 2.1 - Métodos analíticos

**Determinação da biomassa:** a determinação da biomassa, foi feita por espectrofotometria de visível a 660nm.

**Determinação da amónia:** a determinação da concentração de azoto amoniacal foi feita utilizando um eléctrodo selectivo de amónia.

**Determinação de nitrato:** a determinação de nitrato foi feita por espectrofotometria de UV a 220nm, com um tratamento prévio das amostras com 2 volumes de ácido amido-sulfâmico para que todo o nitrito seja removido, uma vez que este composto também absorve a 220nm.

**Determinação de nitrito:** a determinação de nitrito foi feita recorrendo ao método colorimétrico da sulfanilamida.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Ensaio de nitrificação

A estirpe bacteriana estudada, revelou capacidade de utilizar o citrato como fonte de carbono, o que constitui uma grande vantagem dado ser uma fonte de carbono não muito dispendiosa. Foi demonstrado por Papen e outros autores que *Alcaligenes denitrificans* (DSM 30030) é capaz de crescer em meio AC, acumulando nitrito e nitrato durante a fase exponencial de crescimento. Nos ensaios de nitrificação efectuados, não se verificou actividade nitrificante em meio sem arejamento (Fig.1), sendo a amónia degradada utilizada, somente, como fonte de azoto para o crescimento.

Quando o meio é intensamente arejado, verifica-se alguma acumulação de nitrato durante a fase exponencial (Fig.2). Como não foi detectada a presença de nitrato nos dois ensaios efectuados, o processo de nitrificação desempenhado por esta bactéria nas condições dos ensaios resulta somente na oxidação de amónia a nitrito, ao contrário de outros nitrificantes heterotróficos que oxidam amónia a óxido nítrico e nitrito [6,7,8].

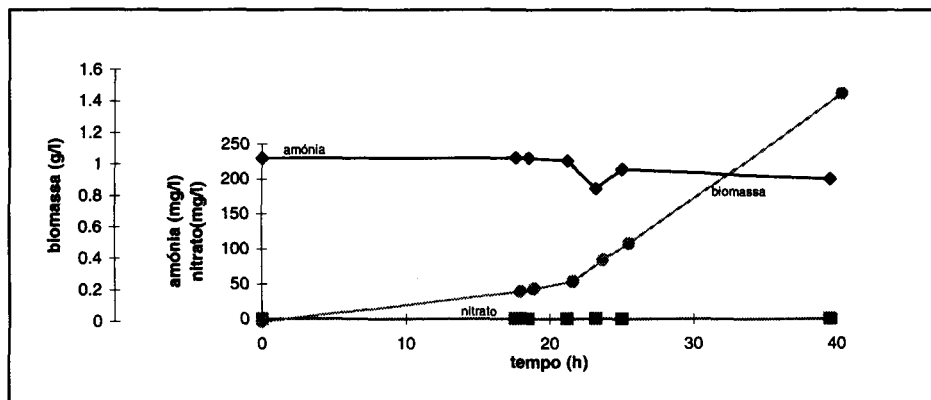


Figura1 - Perfis de biomassa, amónia, nitrito e nitrato registados em meio AC sem arejamento.

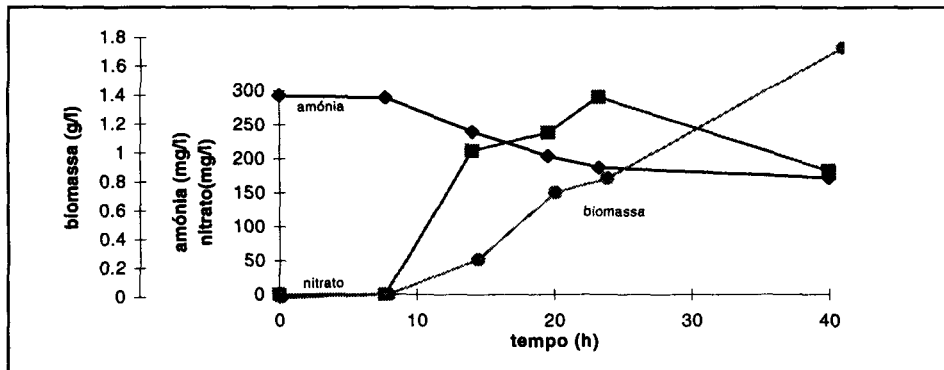


Fig 2 - Perfis de biomassa, amônia, nitrito e nitrato registados em meio AC com arejamento.

Embora tenha ocorrido oxidação da amônia a nitrato em meio AC arejado, a taxa de nitrificação nas condições do ensaio, foi muito baixa (Tabela II).

Tabela II: Tabela comparativa dos resultados obtidos nos ensaios de nitrificação.

meio fermentação [NH <sub>3</sub> ] (mg/l)	$\mu_{\text{máx}}$ (h <sup>-1</sup> )	% azoto nitrificado	% azoto consumido
293	0,07	16,4	41,7
230	0,18	0	12,9

### Ensaio de desnitrificação

A desnitrificação foi estudada em meio de citrato mínimo suplementado com compostos oxidados de azoto. Todas as fermentações foram efectuadas em vasos fechados, sem arejamento e com controlo de temperatura a 24 °C.

*Alcaligenes denitrificans* foi capaz de crescer neste meio, utilizando o nitrato como fonte de azoto, apresentando uma taxa específica de crescimento ligeiramente inferior às taxas específicas de crescimento atingidas em meio AC (Tabela II). Como a quantidade de nitrato consumido foi superior às necessidades de azoto para o crescimento e se verificou a acumulação de nitrito no meio (Fig.3), pode concluir-se que a bactéria exerceu uma actividade desnitrificante. Na Figura 3 pode observar-se, uma diminuição da concentração de nitrato no final do período de latência, sem se registar a presença de nitrito, indicando que não ocorreu a redução do nitrato a nitrito neste período devendo-se a diminuição de nitrato, à incorporação de azoto na biomassa. Nesta fase da fermentação o oxigénio residual é suficiente para assegurar o processo respiratório. Quando a concentração de oxigénio

dissolvido se torna deficiente, o nitrato passa a ser o aceitador final, reduzindo-se a nitrito. Papen e outros autores provaram que os compostos gasosos se formam por redução do nitrito. Os meios disponíveis não permitiram determinar a origem destes compostos, contudo verificou-se uma acentuada diminuição do azoto total na presença de nitrito.

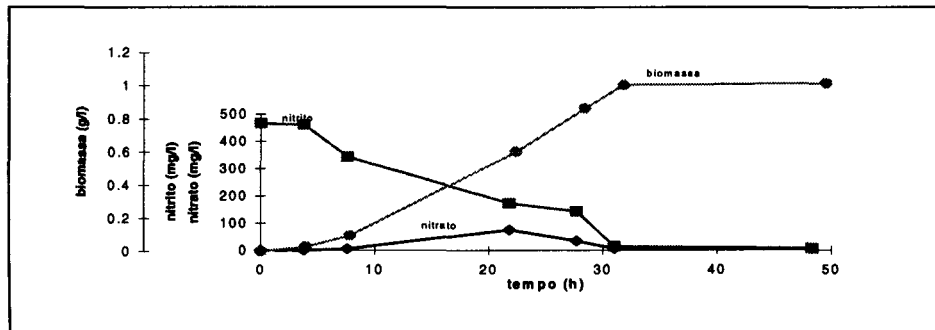


Figura 3 - Perfis de biomassa, nitrito e nitrato registados durante a fermentação em meio citrato suplementado com 0,760 g/l  $\text{KNO}_3$ .

Num meio suplementado somente com nitrito, verificou-se que a máxima diminuição de azoto total ocorre entre as 7 e as 27 horas de fermentação. Neste intervalo de tempo registou-se uma grande diminuição na concentração de nitrito (Fig.4), enquanto que a concentração de nitrato aumenta. A utilização de nitrito como aceitador final de electrões, reduzindo-se a compostos gasosos poderá estar na origem deste facto. O perfil de concentração de biomassa observada neste ensaio, apresenta dois períodos exponenciais de crescimento, intervalados por um período de biomassa estável. Durante o primeiro intervalo de crescimento a concentração de nitrito diminui e começam a aparecer nitrato no meio. O consumo de nitrato inicia-se durante o segundo período de crescimento, registando-se um ligeiro aumento da concentração de nitrito devido à utilização de nitrato como aceitador final. Quando no meio está presente apenas nitrato, a curva de crescimento exhibe um período de latência seguido de uma fase exponencial de crescimento (Fig.3). A diauxia verificada no meio suplementado com nitrito (Fig.4) pode explicar-se pela necessidade de adaptação da bactéria ao meio modificado pelo aparecimento de nitrato. Este facto sugere que o processo de redução de nitrato é sequencial, i.e. inicialmente o nitrato é reduzido a nitrito, que por sua vez é utilizado como aceitador final, convertendo-se em compostos gasosos. Se estiver presente nitrato no meio de fermentação então todo o processo é estimulado. Se somente existir nitrito apenas uma parte da via é induzida.

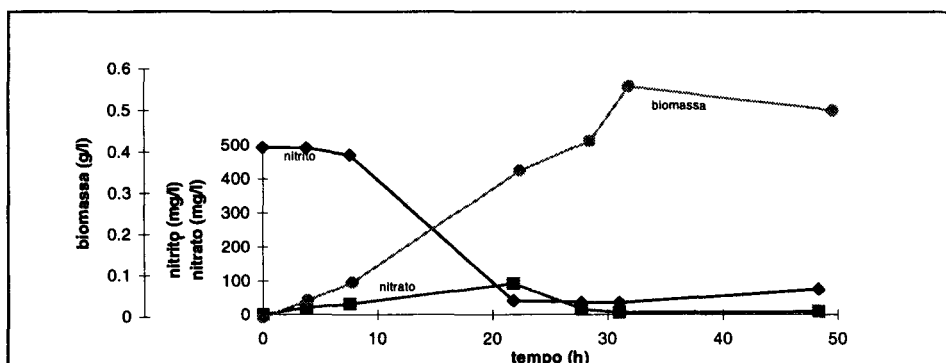


Fig 4 - Perfis de biomassa, nitrito e nitrato registados durante a fermentação em meio citrato suplementado com 0,75 g/l de  $\text{NaNO}_2$ .

Os ensaios até agora efectuados, permitiram verificar que *Alcaligenes denitrificans*, utiliza as duas formas oxidadas de azoto como fontes de azoto e como aceitadores finais de electrões. Se ambas as formas de azoto estiverem presentes no meio em proporções iguais (Fig.5), verifica-se um decréscimo inicial da concentração de nitrato, sugerindo que estes são preferencialmente utilizados como fonte de azoto e como aceitadores finais de electrões. A diminuição da concentração de nitrato acompanha um aumento da concentração de nitrito, provavelmente devido à redução de nitrato a nitrito, quando utilizado como aceitador final de electrões.

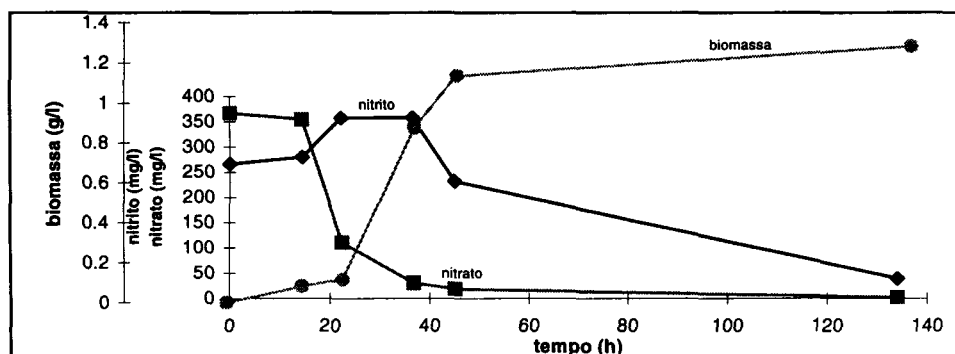


Fig 5 - Perfis de biomassa, nitrito e nitrato registados durante a fermentação em meio citrato suplementado com 0,60 g/l  $\text{KNO}_3$  e 0,40 g/l  $\text{NaNO}_2$ .

A quantidade de azoto desnitrificada nos três ensaios de nitrificação foi aproximadamente a mesma (Tabela III)

Tabela III: Tabela comparativa dos resultados obtidos nos ensaios de desnitrificação.

Meio fermentação [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]	fermentação [NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	μ <sub>máx</sub> (h <sup>-1</sup> )	% Azoto desnitrificado	% Azoto consumido
466	-	0,09	63,2	96,6
	500	0,15 e 0,08	72,7	91,8
184	133	0,09	65,3	92,5

### Ensaio de nitrificação e desnitrificação simultânea.

Os estudos de nitrificação e desnitrificação simultânea, efectuaram-se em meio AC suplementado com nitrato e nitrito. Estudou-se também o efeito do arejamento no processo de desnitrificação, operando um dos fermentadores sem fornecimento de ar e arejando intensamente o outro vaso de fermentação.

Na Figura 6 encontra-se representado o perfil de biomassa, nitrito, nitrato e amónia obtidos em meio AC suplementado com nitrito e nitrato, num fermentador não arejado. O comportamento do nitrito e nitrato registado, foi semelhante ao verificado nos ensaios de desnitrificação (Fig.3). A percentagem de azoto amoniacal consumida neste ensaio foi 52,5% (Tabela IV), este valor é superior ao obtido nos ensaios de nitrificação. Este facto sugere que a presença de espécies oxidadas de azoto no meio, pode estimular a processo de nitrificação.

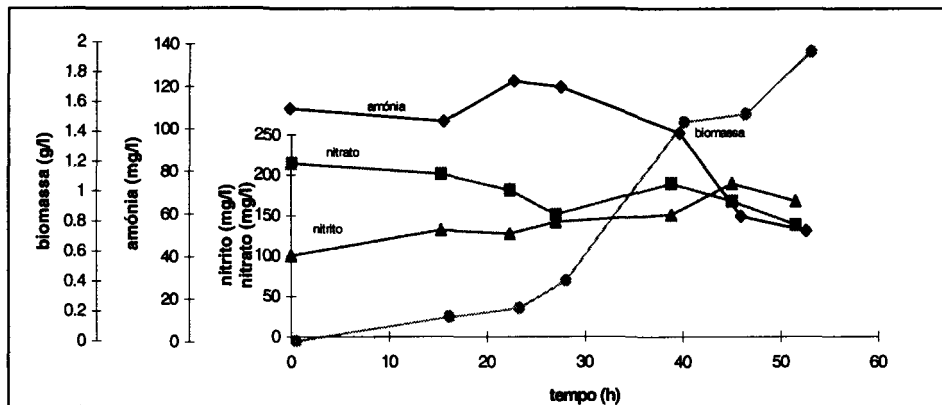


Figura 6: Perfis de biomassa, nitrito, nitrato e amónia registados durante a fermentação em meio AC (0,45 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) não arejado suplementado com 0,36 g/l KNO<sub>3</sub> e 0,16 g/l NaNO<sub>2</sub>.



O oxigénio é um factor limitante do processo de desnitrificação [2], Anderson e outros autores, verificaram que *A. faecalis* só é capaz de desnitrificar eficientemente em  $pO_2$  dissolvidas inferiores a 50% da saturação do ar.

Fez-se crescer *Alcaligenes denitrificans* em meio AC suplementado com nitrito e nitrato e fortemente arejado, os resultados são apresentados na Figura 7.

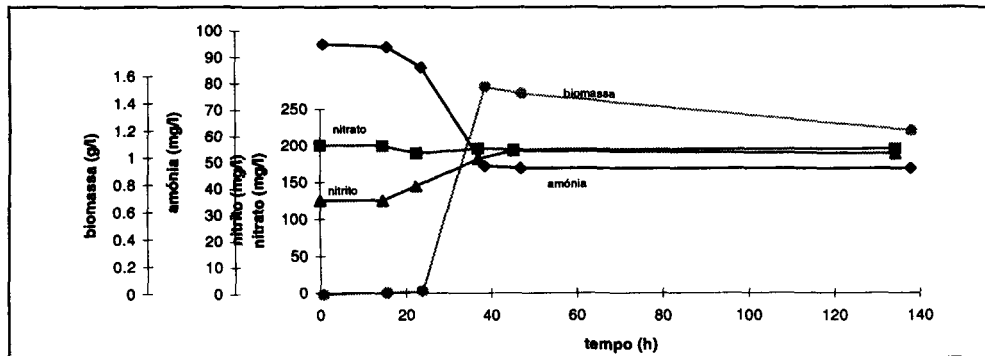


Figura 7: Perfis de biomassa, nitrito, nitrato e amónia registados durante a fermentação em meio AC (0,30 g/l  $(NH_4)_2SO_4$ ) não arejado suplementado com 0,37 g/l  $KNO_3$  e 0,30 g/l  $NaNO_2$ .

Verifica-se que a concentração de nitrito e nitrato permanece praticamente constante, o que indica que estes compostos não foram utilizados pela bactéria nem como fonte de azoto nem como aceptadores finais de electrões. O processo de desnitrificação foi portanto inibido pela presença de oxigénio.

Tabela IV: Tabela comparativa dos resultados obtidos nos ensaios de nitrificação e desnitrificação simultânea.

fermentação			$\mu_{m\acute{a}x}$ $h^{-1}$	% N-NH <sub>3</sub> consumido	% N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> e N-NO <sub>2</sub> consumido
[NH <sub>3</sub> ]	[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]	[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]			
116,0	220,8	106,7	0,11 e 0,04	52,5	52,5
95,4	184,0	133,4	0,29	49,5	0

## CONCLUSÕES

Os sistemas tradicionais de eliminação biológica de compostos azotados, são bastante complexos envolvendo vários microrganismos que se desenvolvem em diferentes condições de operação. A implementação de

sistemas que operem com um só microrganismo capaz de remover a matéria orgânica, oxidar amónia e reduzir nitrato pode apresentar inúmeras vantagens.

A taxa de crescimento de *Alcaligenes denitrificans* em meio AC mostrou ser três vezes superior ao crescimento típico dos nitrificantes autotróficos, contudo as percentagens de nitrificação verificadas foram bastante inferiores às percentagens de nitrificação atingidas nos sistemas tradicionais.

Conseguiram-se percentagens de remoção de amónia superiores em meios anóxicos suplementados com nitrito e/ou nitrato. A bactéria estudada demonstrou capacidade de crescer em meios de citrato suplementados com nitrito e/ou nitrato como única fonte de azoto. Em condições anóxicas, estes compostos oxidados foram utilizados como aceptadores finais de electrões, reduzindo-se a compostos gasosos azotados por um processo de desnitrificação.

A desnitrificação afigurou-se como um processo sequencial em que primeiro o azoto amoniacal é convertido em nitrito e este é reduzido a compostos gasosos. Na presença de nitrito e ausência de nitrato, apenas é estimulada a parte da via desnitrificante responsável pela redução do nitrito.

O oxigénio revelou ser um factor inibitório da desnitrificação, competindo com as espécies oxidadas de azoto pela remoção de electrões.

A eficácia demonstrada pela bactéria estudada na remoção de amónia em ambiente anóxico utilizando o nitrato e/ou nitrito como aceptadores finais, o seu elevado crescimento em meios com amónia e a não necessidade de controlo de pH, constituem grandes vantagens em relação aos demais nitrificantes autotróficos e desnitrificantes. Seria pois interessante aproveitar estas potencialidades para implementar sistemas de tratamento que operem com este microrganismo.

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] - ANDERSON, I. 1993 A comparison of NO and N<sub>2</sub>O production by autotrophic nitrifiers *Nitrosomonas Europaea* and heterotrophic nitrifiers *Alcaligenes faecalis*, App. Env. Micro. 59 (11),.3525-3533.

[2] - ANDERSON, I. 1986 Relative rates of nitric oxide and nitrous oxide production by nitrifiers, denitrifiers and nitrate respirers App. Env. Micro. 51 (5),.938-945.

[3] - BAILEY, J.E., OLLIS, D.F.1987 Biochemical Engineering Fundamentals, 3ª ed. McGraw Hill New York.

- [4] - KRIEG, N., HOLT, J.G., 1980 Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, Vol 1 Williams & Wilkins, London.
- [5] - METCALF AND EDDY 1991 Wastewater Engineering, 3ª ed., McGraw-Hill International Editions.
- [6] - PAPEN, H. 1989 Heterotrophic nitrification by *Alcaligenes faecalis*: NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, N<sub>2</sub>O and NO production in exponential growing cultures", App. Env. Micro. **55** (8), 2068-2072.
- [7] - REIS M., ALMEIDA, J. 1994 Desnitrificação biológica de águas e efluentes, Boletim de Biotecnologia **47**, 27-32.
- [8] - ROBERTSON, L. 1988 Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera Pantotropha*", Appl. Env. Micro. **54** (11), 2812-2818.
- [9] - STANDBURY, P., WHITAKER, A. 1987 Principles of fermentation technology, Pergamon Press, Oxford.