



II-891 – ISOLAMENTO MICROBIANO PARA PRODUÇÃO DE ESTRUVITA

Maria Luiza Paes Xavier⁽¹⁾

Engenheira Civil pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Doutoranda em Engenharia Civil na UFPE.

Endereço⁽¹⁾: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife – PE – CEP: 50670-901 - Brasil - Tel: (81) 99834-5228 - e-mail: marialuiza.xavier@ufpe.br

RESUMO

O aumento populacional impulsiona uma crescente demanda por alimentos e produtos industriais, acarretando em uma dependência de fertilizantes ricos em fósforo (P) e nitrogênio (N) tanto na agricultura quanto na indústria. Contudo, o descarte inadequado desses produtos contribui para a poluição e eutrofização dos recursos hídricos. O Brasil, apesar de sua robustez agrícola, tem uma dependência de 85% de fertilizantes importados, destacando a importância de soluções nacionais para a produção desses nutrientes essenciais. A tecnologia emergente de recuperação de nutrientes, é a precipitação de estruvita ($MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$), oferece uma alternativa promissora ao remover e recuperar N e P de águas residuárias, transformando-os em um fertilizante de liberação lenta. Quando comparada aos métodos convencionais (físico-químicos), a produção biológica de estruvita apresenta vantagens econômicas e ambientais. Apesar de ter muitos estudos com bactérias biom mineralizantes, como *Bacillus pumilus* e *Brevibacterium antiquum*, ainda necessitam de otimização. Assim este estudo investiga a produção de estruvita por bactérias isoladas de pedras de estruvita de origem canina visando reduzir os custos associados ao processo, tornando-o mais eficiente e econômico. O estudo encontrou uma diversidade ativa de bactérias presentes nas pedras dos rins caninas, isolando três colônias bacterianas que tiveram um bom crescimento em meio sintético de urina hidrolisada. Uma delas conseguiu produzir cristais a olho nu a partir do terceiro dia de inoculação, com composição característica a da estruvita. Acredita-se que o Gram da bactéria tem influência na produção dos cristais, uma vez que a colônia Gram negativa produziu cristais extracelularmente, diferentemente das outras colônias. Pode-se concluir que a partir da pedra de estruvita canina consegue-se isolar bactérias que são produtoras de cristais.

PALAVRAS-CHAVE: Isolamento Microbiano, Bioestruvita, Fósforo, Fontes de Magnésio.

INTRODUÇÃO

O crescimento constante da população global gera uma demanda crescente por alimentos e produtos industrializados. Esta crescente necessidade, por sua vez, intensifica a dependência do uso de fertilizantes ricos em fósforo (P) e nitrogênio (N) na produção agrícola e industrial (Castro, 2014). Entretanto, essa prática acarreta consequências significativas para o meio ambiente, uma vez que os resíduos desses fertilizantes, ao serem depositados nos corpos d'água, contribuem para a poluição e eutrofização dos rios (Simoes, 2018).

Adicionalmente, apesar do Brasil ser uma potência agrícola, a dependência externa de 85% de fertilizantes importados em 2022 (EMBRAPA, 2022) evidencia a necessidade de buscar alternativas de produção nacional. Diante da escassez de fósforo, da dependência externa brasileira e do descarte inadequado desses elementos no ambiente, a segurança alimentar, bem como a conservação ambiental e a saúde pública encontram-se ameaçadas (Zeng *et al.*, 2018).

Nesse contexto, surgem as tecnologias de recuperação de nutrientes como soluções para tais desafios, destacando-se a precipitação de estruvita ($MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$), que propicia a remoção e recuperação de N e P de águas residuárias na forma de um fertilizante de dissolução lenta (Soares *et al.*, 2014). A produção biológica da estruvita emerge como uma alternativa vantajosa em relação aos métodos físico-químicos, proporcionando benefícios notáveis tanto na eficiente remoção de nutrientes (N e P), quanto no aspecto financeiro (Kumari; Jagadevan, 2022).



A recuperação de nutrientes de águas residuárias tem sido explorada por meio de bactérias biomineralizantes, embora esse processo ainda careça de otimização e seja pouco conhecido (Leng; Colston; Soares, 2020). Diversas cepas bacterianas, como *Bacillus pumilus*, *Brevibacterium antiquum* e *Halobacterium salinarum*, demonstraram a capacidade de precipitar estruvita a partir de águas residuárias. O isolamento dessas bactérias específicas originárias de fontes locais, visa reduzir os custos associados ao processo, tornando-o mais eficiente e econômico.

Portanto, a integração de práticas sustentáveis, como o tratamento biológico e a produção controlada de estruvita por meio de bactérias isoladas, representa uma estratégia inovadora para enfrentar os desafios ambientais associados ao uso intensivo de fertilizantes ricos em fósforo e nitrogênio. Assim, este estudo tem como objetivo analisar a produção de estruvita por bactérias isoladas de pedras de estruvita de origem canina.

MATERIAIS E MÉTODOS

O processo de isolamento microbiano teve início a partir de uma pedra de estruvita de origem canina adquirida do Departamento de Medicina Veterinária na UFRPE. A pedra foi fragmentada em diferentes distâncias para avaliar a diversidade de microrganismos presentes internamente, variando de acordo com a distância da superfície.



Figura 1: Pedra de estruvita canina e suas camadas.

Fonte: Projeto de bioestruvita do laboratório de biomassa e meio ambiente da UFPE (2023).

O microrganismo foi isolado utilizando um meio enriquecido em fontes de fósforo, magnésio e nitrogênio, adaptado de Park *et al.* (2011) com as seguintes concentrações (g/L): 5 extrato de carne; 5 ureia; 2,81 K_2HPO_4 ; 5 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,25 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,2 KCl; 0,1 $(NH_4)_2SO_4$; 15 ágar. O pH do meio foi ajustado para 7 e autoclavado a 121 °C por 20 minutos. As placas foram incubadas a 30 °C e monitoradas diariamente por até 14 dias.

As primeiras placas foram isoladas por meio de estriamento por esgotamento, enquanto as subsequentes foram estriadas convencionalmente, inspecionadas diariamente para verificação de outros tipos de colônias. Sempre que uma colônia distinta foi identificada, ela foi isolada em, no mínimo, três passagens para assegurar o isolamento, assim como as demais. Posteriormente, o DNA foi extraído utilizando um protocolo caseiro no Laboratório de Genética de Microrganismos na UFPE e enviado para sequenciamento total. Todas as colônias isoladas foram submetidas à análise de Gram.

Após verificar o crescimento em placa no meio adaptado, as bactérias foram transferidas para o meio ATCC3 (15 g/L de ágar; 3 g/L de extrato de carne; 5 g/L de peptona), indicado para crescimento de diversas bactérias e já utilizado com sucesso em projetos anteriores, para verificação de um melhor isolamento.

Posteriormente, foi realizado o estudo do inóculo para avaliar o crescimento microbiano em meio líquido, proporcionando conhecer o ponto ótimo de transferência para o meio de produção de estruvita em estudo. O meio de produção de estruvita consiste em reatores com volume reacional de 200 mL, contendo meio de urina sintética conforme adaptado de Lin *et al.* (2012) substituindo a fonte de magnésio por $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ e 1 mL de

uma solução de micronutrientes (mg/L): 50 H_3BO_3 ; 50 $ZnCl_2$; 30 $CuCl_2$; 50 $MnSO_4 \cdot H_2O$; 50 $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$; 50 $AlCl_3$; 50 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; 50 $NiCl_2$, conforme Huang *et al.* (2015).

O estudo do inóculo foi avaliado nas seguintes etapas temporais: 0, 4, 6, 12, 24 horas e nos dias subsequentes até o terceiro dia, com avaliações em 3 pontos a cada 24 horas e os demais pontos com intervalo de 6 horas. Já em relação à avaliação da produção dos cristais de estruvita, o meio com 10% v/v de inóculo, foi avaliado nos dias 0, 3, 5, 7 e 10 dias. Para o último dia foram realizadas análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) com espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) acoplado e difração de raio-X, além de avaliações de OD (660 nm), consumo de acetato, análise de íons, sólidos suspensos e variação de pH.

RESULTADOS

Após 14 dias de análise das placas de Petri, foram isoladas quatro tipos de colônias, sendo designadas, para melhor entendimento, pelas letras A, B, C, D e E da seguinte forma:

- A: Colônia com coloração branca, textura granulosa, aspecto seco e Gram desconhecido;
- B: Colônia com coloração amarela, textura lisa, aspecto leitoso e Gram positivo;
- C: Colônia com coloração branca, textura lisa, aspecto leitoso e Gram positivo;
- D: Colônia com coloração salmão, textura lisa, aspecto viscoso e Gram negativo;
- E: Colônia com coloração branca, textura lisa, aspecto leitoso e Gram negativo;

Infelizmente, das cinco colônias isoladas, duas tiveram que ser desconsideradas devido à inviabilidade de cultivo e identificação. Em uma das colônias, não foi possível realizar a análise de Gram, e a outra apresentou um tempo de crescimento superior a 10 dias, tornando-a inviável para aplicações comerciais. Consequentemente, as análises prosseguiram com as colônias B, C e E, conforme ilustrado na Figura 2.

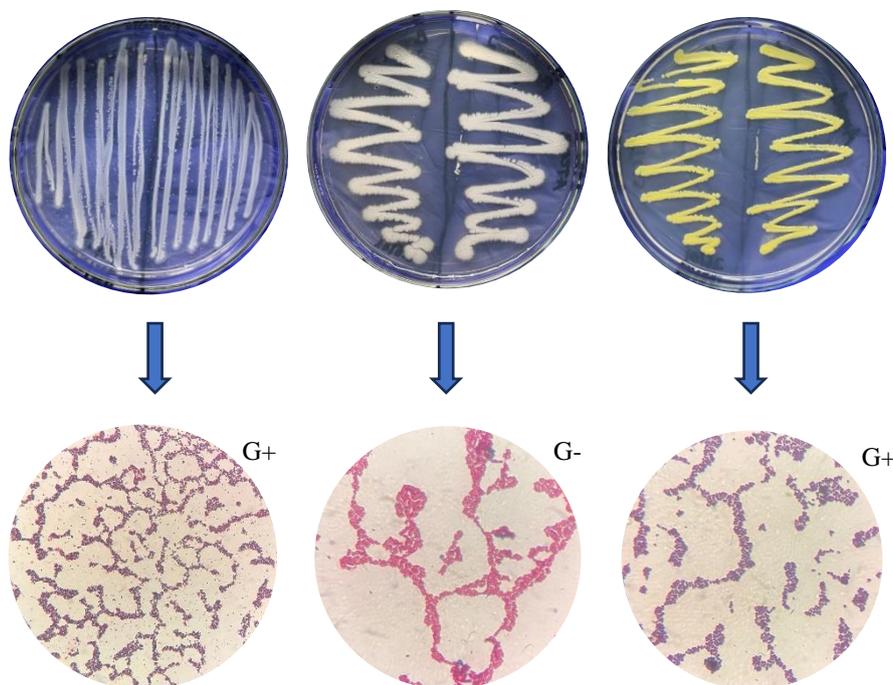


Figura 2: Colônias isoladas e suas respectivas análises de Gram.

A colônia B, caracterizada por sua morfologia cocóide, não apresentou motilidade. Foi identificada como Gram positiva e apresentou arranjo em fileira. Já a colônia C e a colônia E, apresentaram formato de bacilo, ambas dispostas em fileira. No entanto, a colônia C foi identificada como Gram positiva, enquanto a colônia E foi classificada como Gram negativa.



Observou-se, assim como Ashleigh *et al.* (2022) e Coe, Evan e Worcester (2005), a presença de colônias distintas em diferentes camadas da pedra, com repetição de colônias entre elas. No início do processo de isolamento (após 22 horas), todas as placas apresentaram o mesmo tipo de colônia (colônia A). Com 45 horas, as placas, especialmente a referente a menor distância da superfície, revelaram a presença de dois tipos distintos de colônias (A e B), as quais foram isoladas individualmente e posteriormente transferidas para o meio ATCC3. Após 5 dias, apenas duas placas (próximas à superfície e mais próximas do núcleo) apareceram duas novas colônias (C e E).

Conforme surgiam novas colônias, foi observada uma diminuição na atividade de crescimento da colônia A nas placas, embora esta ainda estivesse presente em todas elas. As colônias B, C e E, por outro lado, demonstraram um crescimento rápido em ambos os meios de cultivo, tanto no meio adaptado quanto no meio ATCC3. No entanto, observou-se que, no meio adaptado, elas cresciam associadas à colônia A. Portanto, a transferência para o meio ATCC3 foi crucial para a remoção da colônia A, permitindo o isolamento das demais colônias. Além disso, constatou-se que as colônias B, C e E competiam com a colônia A, uma vez que apresentavam um crescimento consideravelmente menor quando cultivadas em conjunto. Em condições de isolamento, as colônias B e C exibiram um crescimento significativo em 24 horas, enquanto a colônia A não demonstrou crescimento no meio ATCC3.

A análise da velocidade de crescimento microbiano no inóculo foi essencial para transferência do microrganismo em sua taxa específica máxima de crescimento, ou seja, ainda na fase exponencial, com o intuito de minimizar a fase lag no meio utilizado para o estudo da produção de estruvita. Após o estudo do inóculo, constatou-se que, com 20 horas de crescimento as bactérias se encontravam em 2/3 do estágio exponencial. Esta fase é recomendada por especialistas como ideal para transferência e foi adotada como padrão para as três colônias estudadas.

Infelizmente, ainda não se conseguiu identificar quais bactérias são, mas sabe-se que as colônias C e E são do gênero *Bacillus*, faltando identificação da espécie. E a colônia B ainda não foi identificada.

O pH aumentou conforme se passaram os dias de inoculação para todas as colônias analisadas, passando de 6,9 para 8 em 10 dias de análises, e os consumos de acetato foram em cerca de 90%. A curva de crescimento microbiano, não convergiu com nenhuma ordem, uma vez que houve crescimento microbiano enquanto o meio estava em batelada. Portanto, não há um modelo que consiga explicar esse tipo de crescimento. Ao se fazer a análise da produção de estruvita as colônias B, C e E possuíram uma taxa de crescimento de 0,08, 0,10 e 0,13 1/d, respectivamente. As colônias B e C não apresentaram cristais visíveis a olho nu, porém apresentaram 55% e 43% de sólidos fixos presentes nas análises de sólidos suspensos, indicando que os cristais podem ter sido produzidos intracelularmente. No entanto, a colônia E já possuía cristais a partir do terceiro dia de inoculação, os cristais são possíveis de visualizar na Figura 3. Esses cristais, após 10 dias de inoculação, aumentaram de tamanho, conforme observado em estudos anteriores, que verificaram a formação de estruvita em duas etapas. A inicial com o crescimento dos cristais e a posterior com o aumento do diâmetro e peso desses cristais (Tansel; Lunn; Monje, 2018).



Figura 3: Cristais, visíveis a olho nu, produzidos pela colônia E.

Posteriormente os cristais foram caracterizados utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV) acoplada com EDS. Adicionalmente, a caracterização será complementada com análises de Difratomia de Raios-X (DRX) para confirmar a formação de estruvita. A estrutura dos cristais obtidos pela colônia E pode ser visualizada na Figura 4.

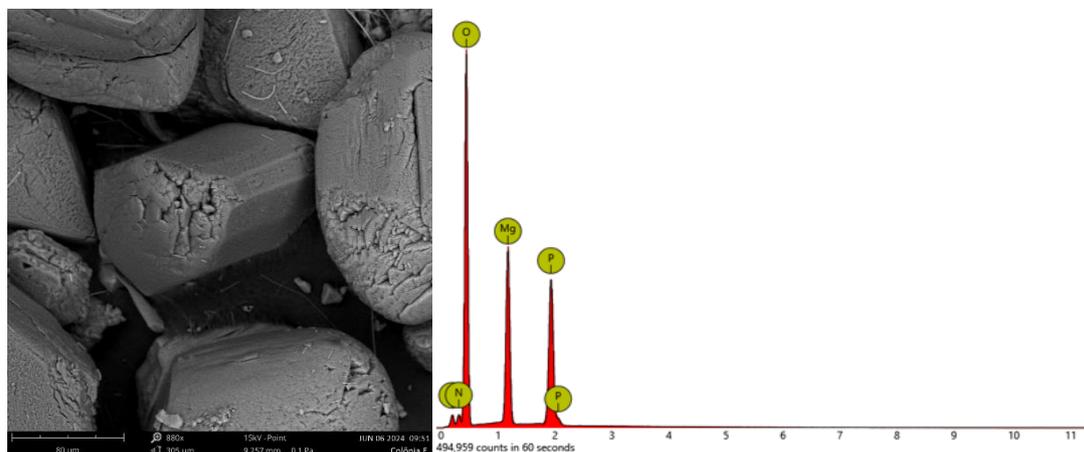


Figura 4: Análise de MEV e EDS dos cristais produzidos pela colônia E.

A análise dos cristais revelou a presença de nitrogênio, magnésio e fósforo, elementos característicos da estruvita, conforme detectado pela técnica de EDS. Esses resultados preliminares são indicativos da formação de estruvita, uma vez que a composição química está em conformidade com as características esperadas para esse mineral, que será confirmada pela análise de DRX. A colônia E produziu cristais extracelularmente, talvez isso esteja associado ao Gram da bactéria, tendo em vista que esta possui Gram diferente das outras duas testadas.

A análise de íons ainda não foi concluída, porém em estudos anteriores, o ajuste cinético geralmente é realizado considerando modelos de primeira ordem, visto que outras ordens não convergem para os consumos de acetato e nutrientes. Ou seja, os modelos ajustados não apresentam um valor satisfatório de R^2 .

CONCLUSÕES

Foram encontradas uma diversidade ativa de bactérias presente nas pedras dos rins caninas. A interação entre as colônias tem influência no crescimento delas, tendo em vista que seu crescimento isolado, ocorre em pouco tempo.

Verifica-se que o Gram da bactéria tem influência na produção dos cristais, uma vez que a colônia Gram negativa produziu cristais extracelularmente, diferentemente das outras colônias. Pode-se concluir que a partir da pedra de estruvita canina consegue-se isolar bactérias que são produtoras de cristais.

Recomenda-se o isolamento por meio de jazidas fosfáticas ou unidade de processamento de minerais fosfatados ou de tratamento de efluentes de refrigerante, podendo resultar em outras cepas bacterianas e uma melhor produção de estruvita.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Park, J.H.; Bolan, N.; Megharaj, M.; Naidu, R. Isolation of phosphate solubilizing bacteria and their potential for lead immobilization in soil. *Journal of Hazardous Materials*, v. 185, p. 829-836, 2011.
2. KUMARI, S.; JAGADEVAN, S. Phosphorus recovery from municipal wastewater through struvite biomineralization using model gram-negative and gram-positive bacterial strains. *Journal of Cleaner Production*, v. 366, artigo n. 132992, 2022.
3. LENG, Y.; COLSTON, R.; SOARES, A. Understanding the biochemical characteristics of struvite biomineralising microorganisms and their future in nutrient recovery. *Chemosphere*, v. 247, artigo n. 125799. 2020.



SIMPÓSIO LUSO-BRASILEIRO
DE ENGENHARIA SANITÁRIA
E AMBIENTAL



4. LENG, Y.; SOARES, A. Microbial phosphorus removal and recovery by struvite biomineralisation in comparison to chemical struvite precipitation in municipal wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 11, artigo n. 109208. 2023.
5. LENG, Y.; SOARES, A. The mechanisms of struvite biomineralization in municipal wastewater. *Chemosphere*, v. 799, artigo n. 149261. 2021a.
6. LENG, Y.; SOARES, A. Understanding the mechanisms of biological struvite biomineralization. *Chemosphere*, v. 281, artigo n. 130986. 2021b.
7. SIMÕES, F.; COLSTON, R.; ROSA-FERNANDES, C.; VALE, P.; STEPHENSON, T.; SOARES, A. Predicting the potential of sludge dewatering liquors to recover nutrients as struvite biominerals. *Environmental Science and Ecotechnology*, article 3, n. 100052, 2020.
8. TANSEL, B.; LUNN, G.; MONJE, O. Struvite formation and decomposition characteristics for ammonia and phosphorus recovery: A review of magnesium-ammonia-phosphate interactions. *Chemosphere*, v. 194, p. 504 - 514, 2018.
9. ZENG, F.; ZHAO, Q.; JIN, W.; LIU, Y.; WANG, K.; LEE D. J. Struvite precipitation from anaerobic sludge supernatant and mixed fresh/stale human urine. *Chemical Engineering Journal*, v. 344, p. 254 – 261, 2018.