



## Desenvolvimento de reator de inóculo de bactérias com atividade anammox para aplicação em processos de remoção de nitrogênio

### Development of anammox inoculum reactor for application in nitrogen removal process

Julia Echer Serpa<sup>1</sup>, Alessandra dos Santos Misael<sup>2</sup>, Nicholas Luquirini Penteados dos Santos<sup>3</sup>, Heloísa Campeão Rodrigues<sup>4</sup>, Marina Celant De Prá<sup>5</sup>

#### RESUMO

Os processos biológicos de remoção de nitrogênio em efluentes agroindustriais têm se destacado, dentre eles, os métodos avançados utilizando bactérias anammox estão sendo amplamente aplicados. Essas bactérias possuem vantagens em relação aos processos convencionais, pois alcançam cargas até 100 vezes maiores de remoção de nitrogênio. No entanto, o tempo de duplicação dessas bactérias ainda é um entrave para a implementação do processo em larga escala. Por isso, é importante o desenvolvimento de estratégias de partida de reatores que diminuam a taxa de duplicação para que este possa ser amplamente utilizado. Sendo assim, o presente trabalho visou desenvolver um reator de inóculo para enriquecimento de bactérias anammox, operando em fluxo contínuo, em anaerobiose, com tempo de retenção hidráulica de 3,3 horas, sob condições controladas de temperatura (25 - 35°C), pH (7 - 9) e concentração de amônia e nitrito presentes no meio de cultivo de 50 mg.L<sup>-1</sup>. Após a partida do reator, foram encontradas dificuldades operacionais para manter o sistema em anaerobiose e equilibrar as concentrações de amônia e nitrito na entrada do reator. Em função disso, o processo anammox acabou sendo suprimido pela atividade de bactérias nitrificantes. Novas estratégias serão adotadas para estabelecer e melhorar o processo no reator.

**PALAVRAS-CHAVE:** anammox; remoção de nitrogênio; efluentes agroindustriais.

#### ABSTRACT

The biological processes of nitrogen removal from agro-industrial effluents have stood out, among them, the advanced methods using anammox bacteria are being widely applied. These bacteria have advantages over conventional processes, as they achieve up to 100 times higher nitrogen removal loads. However, the duplication time of these bacteria is still a hindrance to the implementation of the process on a large scale. Therefore, it is important to develop start-up strategies for reactors that reduce the duplication rate so that this process can be widely used. Thus, the present work aimed at the develop an inoculum reactor for enrichment of anammox bacteria, operating in continuous flow, in anaerobiosis, with hydraulic retention time of 3,3 hours, under controlled conditions of temperature (25 - 35°C), pH (7 - 9) and concentration of ammonia and nitrite present in the growing medium of 50 mg.L<sup>-1</sup>. After the start-up, operational difficulties were found to maintain the system in anaerobiosis, and balance the concentrations of ammonia and nitrite at the reactor inlet. As a result, the anammox process was suppressed by the activity of nitrifying bacteria. New strategies will be adopted to establish and improve efficiency of the process in the reactor.

**KEYWORDS:** anammox; nitrogen removal; agro-industrial effluents.

<sup>1</sup> Bolsista do PIBIC. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil. E-mail: juliaserpa@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 8777813902793922.

<sup>2</sup> Bolsista do PIBIT. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil. E-mail: amisael@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 4390504568997058.

<sup>3</sup> Bolsista voluntário. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil. E-mail: nicholaspsantos@hotmail.com. ID Lattes: 4083119051424107.

<sup>4</sup> Docente do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. N Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil. E-mail: campeaoheloisa@gmail.com. ID Lattes: 3877530874725839.

<sup>5</sup> Docente no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - PPGBIOTEC-DV/PG. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil. E-mail: marinapra@utfpr.edu.br. ID Lattes: 2213588017689303.



## INTRODUÇÃO

O crescimento das atividades agroindustriais é resposta à crescente demanda mundial por alimentos e produtos agrícolas. No entanto, como consequência há uma preocupação dos órgãos ambientais quanto aos impactos associados a essa expansão. O nitrogênio é um dos principais poluentes presentes nas águas residuais oriundas dessas atividades, podendo causar a eutrofização de corpos hídricos e problemas de saúde pública (AHN, 2006).

Usualmente nas estações de tratamento, os processos de remoção de nitrogênio inexistem ou quando existem não suprem a tratabilidade exigida pelas legislações vigentes. Nesse contexto, as bactérias com atividade anammox surgem como uma abordagem inovadora e eficaz, já que esses microrganismos possuem a capacidade de remover altas cargas de nitrogênio. O processo anammox trata-se da oxidação anaeróbia da amônia, tendo o nitrito como acceptor final de elétrons, diretamente a nitrogênio gasoso. O processo é totalmente autotrófico e acontece em condições anaeróbias (DE PRÁ, 2017).

As principais vantagens desse processo residem na economia no consumo de energia em aproximadamente 60% com relação aos processos convencionais de nitrificação/desnitrificação, pois os reatores não necessitam de aeração (MARONEZE et al., 2014). Além disso, há redução no volume de lodo gerado e devido a elevada eficiência de remoção, os reatores são menores, garantindo uma economia de espaço nas instalações de tratamento (ALI; OKABE, 2015).

As bactérias anammox são uma alternativa promissora para o tratamento de efluentes com alto teor de nitrogênio, contudo, a sua aplicação em plantas reais enfrenta alguns obstáculos, como o tempo de duplicação elevado, que pode chegar a 11 dias (STROUS et al., 1998). Além disso, a implementação de reatores anammox requer grandes quantidades de inóculo, que ainda é um recurso escasso e caro, sendo um desafio não resolvido da tecnologia, pois apesar de elas serem eficientes, também são sensíveis a oscilações externas como choques de carga, temperatura e supressão por carbono.

A atividade do grupo de pesquisa em gerenciamento e tratamento de resíduos (GETRAT) na linha de remoção de nitrogênio envolve pesquisas e desenvolvimento de reatores de nitrificação parcial e desamonificação. Nesse sentido, para o desenvolvimento das atividades do grupo é essencial uma cultura enriquecida com anammox para viabilizar os experimentos.

Sendo assim, o objetivo do trabalho em questão é desenvolver um reator de inóculo para bactérias com atividade anammox visando a aplicação em processos de remoção de nitrogênio, utilizando uma cultura mista enriquecida como fonte de inóculo cedida pela Embrapa Suínos e Aves de Concórdia - SC.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Inóculo e sistema experimental

O reator de inóculo foi desenvolvido com objetivo de enriquecer as bactérias com atividade anammox, para isso, aproximadamente 100 mL de biomassa mista enriquecida proveniente da Embrapa Suínos e Aves sob número de acesso: BRMSA 00323 (VIANCELLI et al., 2011), foi inicialmente aclimatada em cone Imhoff de 1 L. Visando manter a estabilidade do processo, o reator foi alimentado com meio sintético contendo todos os micros e macroelementos necessários para favorecer a atividade anammox, conforme

descrito por Van der Graaf *et al* (1996), e nas concentrações de  $50 \text{ mgNH}_4 \text{ L}^{-1}$  e  $50 \text{ mgNO}_2 \text{ L}^{-1}$ . Para garantir um ambiente anóxico, foi adicionado ao meio de cultivo cerca de  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  de bissulfito de sódio ( $\text{NaHSO}_3$ ) como agente sequestrante de oxigênio. Esta é uma estratégia pouco utilizada, mas devido a impossibilidade de utilizar gases como o  $\text{N}_2$  ou ar para realizar a purga do oxigênio dissolvido (OD) durante a maior parte do experimento, se mostrou como uma possibilidade.

Durante o período de aclimação, que durou 3 dias, o reator operou em batelada sem agitação e com vazão de recirculação de  $16 \text{ mL/min}$  até que fosse feita a cinética para determinar os parâmetros ideais de operação do reator de inóculo.

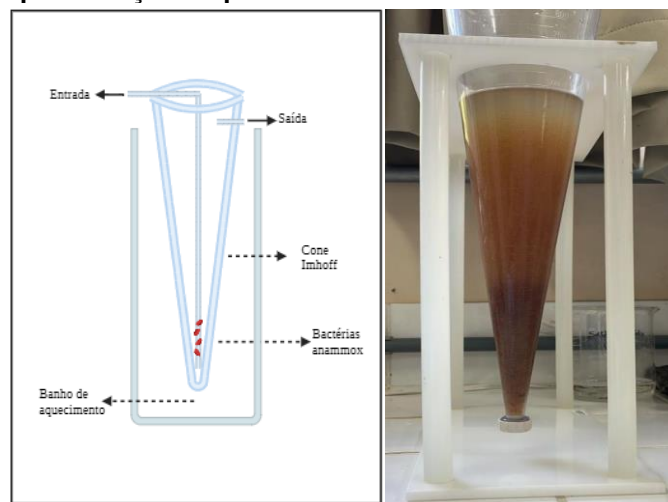
### Cinética

Para avaliar a atividade específica das bactérias anammox e determinar as condições operacionais realizou-se uma cinética de consumo de amônia e nitrito. Para isso foram utilizados  $100 \text{ mL}$  de biomassa anammox e  $900 \text{ mL}$  de meio sintético nas concentrações de  $50 \text{ mgNH}_4 \text{ L}^{-1}$  e  $65 \text{ mgNO}_2 \text{ L}^{-1}$ , sob condições controladas de pH ( $8,7 \pm 0,25$ ), temperatura ( $27 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ) e OD ( $0,00 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ ). O tempo determinado para cinética foi de 10 horas, e em períodos pré-determinados foram coletadas alíquotas para posterior quantificação de amônia, nitrito e nitrato, sendo que nas primeiras 4 horas foram realizadas coletas a cada 30 minutos e, após a quarta hora, as coletas eram realizadas a cada 1 hora. A partir dos resultados obtidos na cinética foi possível determinar as concentrações de amônia e nitrito a serem utilizadas como substrato no reator de inóculo e avaliar o tempo de retenção hidráulica (TRH) ideal.

### Condições operacionais do reator

O reator de inóculo anammox está ilustrado na Figura 1. Ele operou de forma contínua com um TRH de 3,3 h a uma vazão de  $1,66 \text{ mL/min}$ . O pH foi mantido entre 7 e 9, e a temperatura entre  $25$  e  $35^\circ\text{C}$  (DE PRÁ, 2017). O monitoramento analítico do reator foi realizado através de análises de amônia, nitrito, nitrato e alcalinidade, das amostras que foram coletadas da entrada e saída do reator cinco vezes por semana e realizadas conforme os procedimentos descritos em Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012).

Figura 1 - Representação esquemática e foto do reator durante o experimento



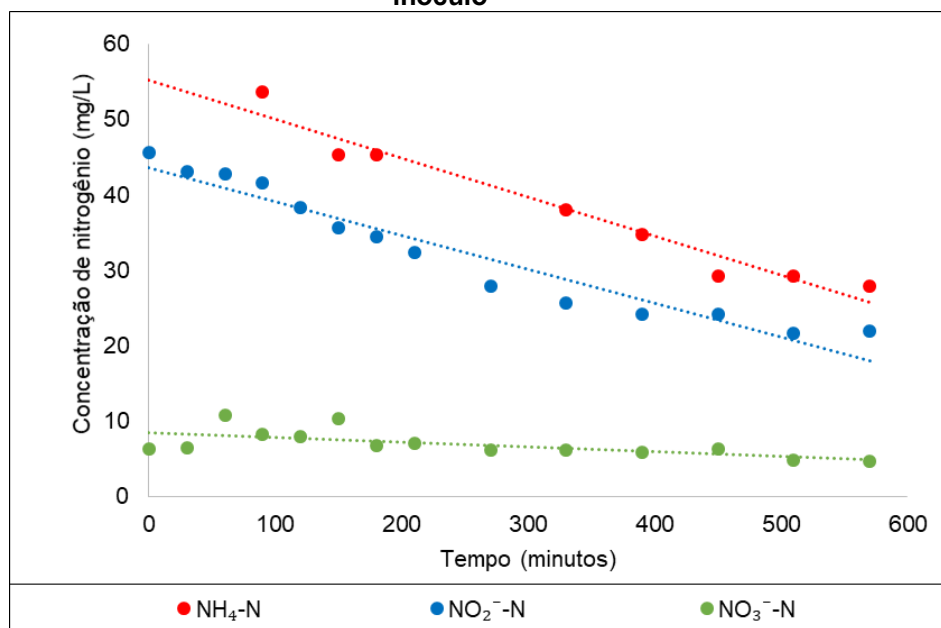
Fonte: Autoria própria.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Cinética

A cinética de consumo de substrato apresentou comportamento linear tanto para  $\text{N-NH}_3$  quanto para  $\text{N-NO}_2$ , representado pelos valores de  $R^2$  de 0,956 e 0,9352 respectivamente. Entretanto, as velocidades de consumo de amônio e nitrito ( $r_{\text{N-NH}_3} = 0,05 \text{ mgN-NH}_3/\text{L.h}$  e  $r_{\text{N-NO}_2} = 0,045 \text{ mgN-NO}_2/\text{L.h}$ ) e a atividade específica das bactérias anammox obtidas a partir da cinética ( $\mu_{\text{N-NH}_3} = 0,02 \text{ mgN-NH}_3/\text{gSSV.h}$  e  $\mu_{\text{N-NO}_2} = 0,017 \text{ mgN-NO}_2/\text{gSSV.h}$ ) foram menores do que as descritas na literatura. A mesma análise foi realizada por De Prá *et al* (2013) e os resultados obtidos foram de  $1,76 \text{ mgN-NH}_3/\text{gSSV.h}$  e  $2,25 \text{ mgN-NO}_2/\text{gSSV.h}$ . A comparação dos resultados indica que a atividade específica das bactérias anammox estava desfavorecida, exigindo uma aclimação para seu enriquecimento.

Figura 3 - Gráfico da cinética de consumo de substrato das bactérias anammox utilizadas como inóculo



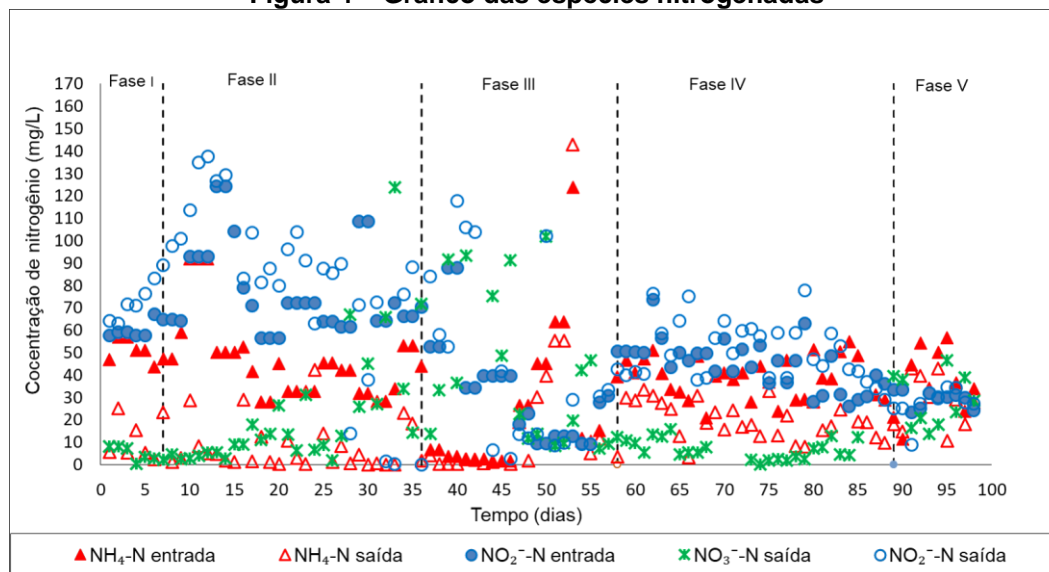
Fonte: Autoria própria.

### Operação do reator

A Figura 4 apresenta os resultados obtidos de amônia, nitrito e nitrato ao longo dos 100 dias de operação do reator. De acordo com os resultados obtidos, o gráfico correspondente à Figuras 4 foi dividido em cinco fases para melhor compreensão dos resultados.



Figura 4 – Gráfico das espécies nitrogenadas



Fonte: Autoria própria.

No período compreendido pelas fases I e II predominou o processo de nitrificação, sendo possível observar a atividade das bactérias oxidadoras de amônia (BOA) a partir das elevadas concentrações de nitrito presentes na saída do reator. Ainda, ao final da fase II é possível observar a presença de nitrato na saída do reator, indicando a ação de bactérias oxidadoras de nitrito (BON). Isso pode se justificar devido a dificuldade em manter a concentração de OD zerada no reator, visto que o oxigênio é um doador de elétrons para as bactérias nitrificantes e um inibidor do processo anammox. Considerando que se trata de uma cultura mista enriquecida, a presença de oxigênio e dos substratos necessários estimulou outros grupos bacterianos, que se multiplicam mais rápido do que as bactérias com atividade anammox.

Devido a dificuldade operacional em manter as concentrações estáveis no meio de cultivo, entre os dias 36 e 58 de operação (fase III), a entrada de amônia estava em concentrações muito abaixo do que é necessário para a atividade anammox, enquanto a entrada de nitrito se manteve elevada. Como consequência, houve alta produção de nitrato pelas BON. A partir da quarta fase o controle de OD foi realizado através da purga de nitrogênio gasoso no meio de cultivo, por isso as concentrações de OD passaram a se manter em  $0,00 \text{ mg.L}^{-1}$ . Apesar disso, as concentrações de nitrito da saída eram maiores do que na entrada, o que é indicativo de que as BOAs permaneciam se sobressaindo sobre a atividade anammox.

Durante a fase V as bactérias não apresentaram melhora de quadro e não respondiam de acordo com a estequiometria do processo. Ao fim do dia 100 de operação, verificou-se a necessidade de adotar novas estratégias para o estabelecimento e eficiência do processo em um novo reator, a partir de uma nova fonte de inóculo anammox.

## CONCLUSÃO

Devido à baixa velocidade de duplicação das bactérias com atividade anammox é necessário realizar a otimização da configuração dos reatores, bem como, ter um controle rigoroso das condições de operação e aclimação dos microrganismos. O desempenho



total do reator ao longo dos 100 dias de operação do reator a atividade das BOA prevaleceram sobre as bactérias anammox, indicando como a presença de OD afeta a atividade das anammox e deixando claro o estabelecimento de estratégias para melhor desempenho de um reator de inóculo.

### Agradecimentos

A Fundação Araucária pela bolsa concedida PIBIC-UTFPR, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fomento de projeto e ao LABIA (Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Alimentos) pela concessão do espaço e equipamentos que tornaram possível a realização deste trabalho.

### Conflito de interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

### REFERÊNCIAS

AHN, Y. H. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. **Process Biochemistry**, ago. 2006.

APHA – American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22 ed. Washington, DC: **American Public Health Association**, 2012.

DE PRA, M. C. Estabelecimento e estudo cinético do processo de desamonificação utilizando-se um reator único para remoção de nitrogênio à temperatura ambiente. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), UFSC, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013

DE PRÁ, M. C. Desenvolvimento e validação de protótipo de reator para aplicação do processo de desamonificação utilizando digestato da suinocultura, 2017.

MARONEZE, M. M. et al. A tecnologia de remoção de fósforo: Gerenciamento do elemento em resíduos industriais. **Revista Ambiente e Agua**, v. 9, n. 3, p. 445–458, 2014.

VAN DE GRAAF, A. A. et al. Autotrophic Growth of Anaerobic Ammonium oxidizing microorganisms in a Fluidized Bed Reactor. **Microbiology**, v.142, p.2187-2196, 1996.

WANG, G. et al. A pilot-scale study on the start-up of partial nitrification-anammox process for anaerobic sludge digester liquor treatment. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 181–189, 2017.

ZOPPAS, F. M.; BERNARDES, A. M.; MENEGUZZI, Á. Parâmetros operacionais na remoção biológica de nitrogênio de águas por nitrificação e desnitrificação simultânea. **Engenharia Sanitária e Ambiental ABES - Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental**, 1 jan. 2016.