



## AValiação DA VIABILIDADE DE PRESERVAÇÃO, ARMAZENAMENTO E REATIVAÇÃO DO PROCESSO ANAMMOX

Lucas Antunes Scussiato<sup>1\*</sup>; Airton Kunz<sup>2</sup>; Marcelo Bortoli<sup>3</sup>; Aline Viancelli<sup>3</sup>;  
André C. do Amaral<sup>1</sup>, Lidimara Suzin<sup>4</sup>

### INTRODUÇÃO

Apesar de pouco difundidas no Brasil, biotecnologias para remoção de nitrogênio são de baixo custo financeiro e operacional quando comparadas com processos químicos e físicos para esta mesma finalidade. O processo biológico convencional (Nitrificação-Desnitrificação) é um dos processos mais conhecidos, baseada na nitrificação aeróbia autotrófica e posterior desnitrificação em uma etapa anóxica e heterotrófica (Kunz, 2007; Scheeren, 2011).

O processo de oxidação anaeróbia da amônia, ou ANAMMOX (do inglês *anaerobic ammonium oxidation*), é considerado um dos mais inovadores avanços tecnológicos na remoção de nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) de águas residuais, sendo capaz de remover altas concentrações de nitrogênio. Atuando em condições anóxicas, microrganismos oxidam o íon amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) diretamente a nitrogênio gasoso (N<sub>2</sub>), utilizando nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) comoceptor final de elétrons (Strous *et al.*, 1998).

Nesse processo não há necessidade de fonte externa de carbono orgânico, pois o mesmo é fornecido por bactérias autotróficas, diminuindo os custos com dosagem de reagentes quando se objetiva o tratamento de efluentes com baixa relação Carbono/Nitrogênio. Além disso, uma das maiores vantagens do processo está na capacidade de remoção de altas cargas de nitrogênio com baixo tempo de retenção hidráulica (Cho *et al.*, 2010).

Outra vantagem do processo está no tempo de duplicação para essas bactérias que é de 9 a 11 dias e resulta em baixa produção de biomassa (0,11 g SSV/g N- NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), reduzindo assim custos com o tratamento do lodo. O alto tempo de duplicação pode resultar em um *start-up* mais lento do sistema (Jetten *et al.*, 2001; Strous *et al.*, 1998), levando de três a mais de sete meses de operação para obter uma cultura enriquecida e estabilizada (Jetten *et al.*, 2001).

Estudos recentes revelam o potencial para conservação de bactérias ANAMMOX utilizando métodos de longo prazo. Vlaeminck *et al.* (2007), congelou a biomassa ANAMMOX em -20°C com e sem a utilização de agente crioprotetor, nesse caso o glicerol. Rothrock *et al.* (2011), optaram por utilizar métodos como a criopreservação e liofilização. Antes do processo de liofilização, duas temperaturas para criopreservação foram utilizadas, na primeira a biomassa foi pré-congelada a -70°C e na segunda utilizando nitrogênio líquido -196°C. Somente a biomassa pré-congelada com nitrogênio líquido apresentou estabilidade no processo, permanecendo próximo das razões estequiométricas.

Em função do exposto, se faz necessário estudar métodos para conservação, armazenamento e posterior reativação desse processo, utilizando culturas altamente enriquecidas e estabilizadas para obter melhores resultados no *start-up* do sistema (Rothrock *et al.*, 2011). Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade para preservar bactérias ANAMMOX através do método de liofilização. Para confirmar a reativação do processo, os resultados obtidos foram comparados com a estequiometria do processo proposta por Strous *et al.* (1998).



## METODOLOGIA

A biomassa utilizada, previamente enriquecida e estabilizada, foi proveniente de um biorreator experimental piloto de bancada, alimentado com meio de cultura sintético em fluxo ascendente e concentração de  $200 \text{ mgN L}^{-1}$  sendo (50% na forma de  $\text{N-NH}_3$  e 50% na forma de  $\text{N-NO}_2^-$ ).

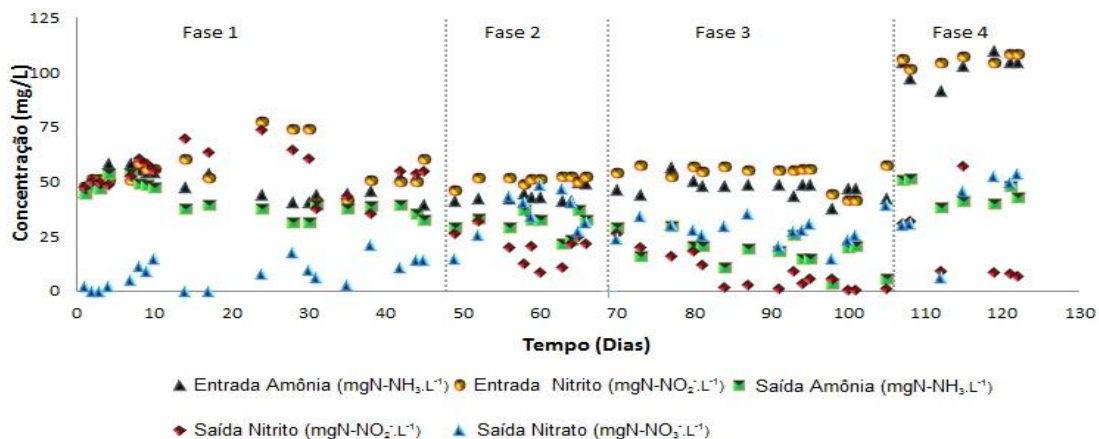
A biomassa colhida ( $20\% \text{ v.v}^{-1}$ ) foi lavada e peneirada para remover os nutrientes residuais antes de preservá-la. A mesma foi transferida para um tubo de centrífuga ( $50 \text{ mL}$ ), sendo adicionado glicerol ( $25\% \text{ v.v}^{-1}$ ) com o objetivo de atuar como agente crioprotetor (Rothrock et al., 2011) e posteriormente pré-congelada a  $-20^\circ\text{C}$  e liofilizada. Após quatro meses de armazenamento em  $-20^\circ\text{C}$ , a biomassa foi descongelada em um banho termostatizado em  $34^\circ\text{C} \pm 1$  por 1 hora. Logo após descongelamento, lavou-se a biomassa com meio de cultura sintético ( $100 \text{ mgN.L}^{-1}$ ) para que todo glicerol residual fosse removido.

O sistema experimental foi composto por um tubo de ensaio de vidro com volume útil de  $0,1 \text{ L}$ , fluxo ascendente e alimentado no primeiro momento com meio de cultura sintético com concentração de  $100 \text{ mgN.L}^{-1}$  operando em regime contínuo. O biorreator foi inoculado com 20% do volume total do reator de biomassa ( $\text{v.v}^{-1}$ ), tempo de retenção hidráulica (TRH) de 0,55 horas e temperatura controlada durante todo período experimental  $34^\circ\text{C} \pm 1$ . No segundo momento posteriormente à estabilização do processo, realizou-se progressão e carga por aumento da concentração de  $100 \text{ mg N.L}^{-1}$  para  $200 \text{ mg N.L}^{-1}$  (50% na forma de  $\text{N-NH}_3$  e 50% na forma de nitrito ( $\text{N-NO}_2^-$ )).

As análises de nitrogênio na forma de nitrito ( $\text{N-NO}_2^-$ ), nitrato ( $\text{N-NO}_3^-$ ), e  $\text{N-NH}_3$ , foram parâmetros utilizados para a reativação do processo ANAMMOX. Realizaram-se análises de duas a três vezes por semana (APHA, 2012).

## RESULTADO E DISCUSSÃO

A (Figura 01) ilustra o acompanhamento das formas nitrogenadas, sendo que a fase 1 corresponde ao tempo de partida do reator, com duração de aproximadamente 48 dias. Os resultados mostram que praticamente não houve alterações nas saídas de  $\text{N-NH}_3$  e  $\text{N-NO}_2^-$ , permanecendo próximas das concentrações de entrada. A produção de  $\text{N-NO}_3^-$  do mesmo modo não sofre influência, permanecendo próxima da neutralidade, não apresentando momentaneamente atividade do processo ANAMMOX.



**Figura 01** - Acompanhamento das concentrações das formas nitrogenadas.

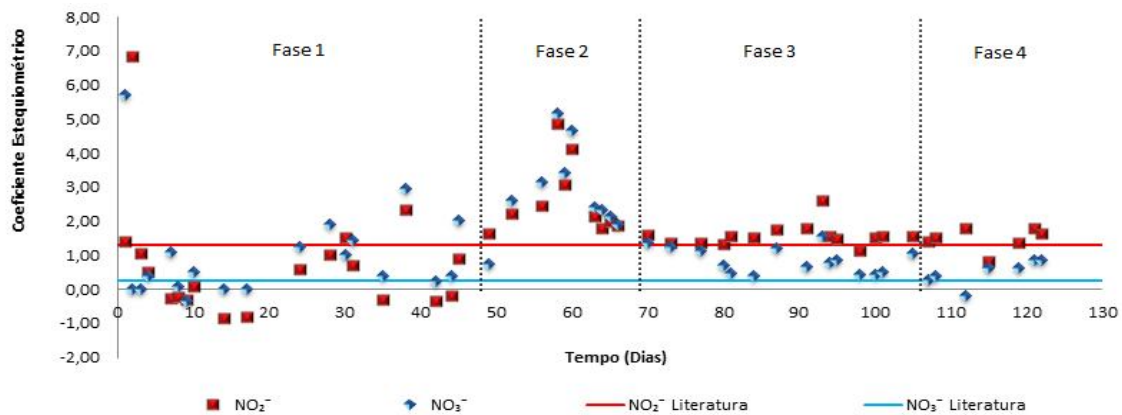
Na fase 2 marcada pelo período do 49º ao 69º dias de operação, nota-se o começo do consumo de  $\text{N-NO}_2^-$  e uma elevada produção de  $\text{N-NO}_3^-$ , indicando que algum grau de



nitrificação estava ocorrendo no processo de reativação. Devido à taxa de duplicação de bactérias ANAMMOX serem de aproximadamente 11 dias, favorecem outros microrganismos como as nitrificantes, que têm taxa de duplicação de aproximadamente 7 horas (Strous, 1998; Hommes, 2003).

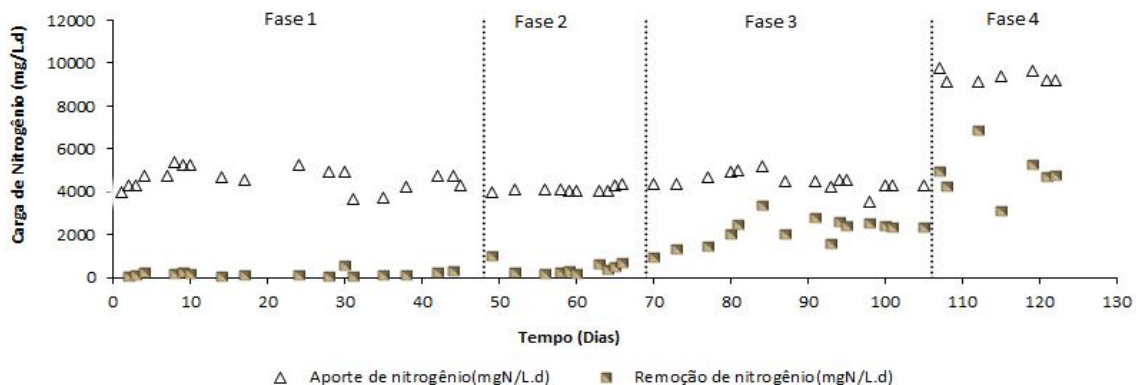
Para tentar diminuir a atividade nitrificante, manteve-se o tempo de retenção hidráulica (TRH) em 0,55 horas, com objetivo de arrastar bactérias nitrificantes do sistema devido à alta vazão. Aproximadamente aos 70 dias de operação observa-se o início do consumo de  $N-NH_3$  e o estabelecimento do processo ANAMMOX, marcando assim a fase 3.

A Figura 02 apresenta os coeficientes estequiométricos do estudo e os compara aos encontrados na literatura (Strous *et al.*,1998) o que demonstra que a partir da fase 3 a atividade ANAMMOX permanece relativamente constante.



**Figura 02** – Acompanhamento dos coeficientes estequiométricos das formas  $NO_2^-$  e  $NO_3^-$ . Linha vermelha: 1,32 mols, valor estequiométrico de  $NO_2^-$  para reação ANAMMOX (Strous *et al.*,1998). Linha Azul: 0,26 mols, valor estequiométrico de  $NO_3^-$  para reação ANAMMOX (Strous *et al.*,1998).

Através da figura 03, percebe-se o início da remoção de nitrogênio após um período de aproximadamente 80 dias de operação (Fase 3). A partir desse momento, o reator obteve eficiência média de  $54\% \pm 10$  na remoção de nitrogênio, eficiência essa considerada alta quando comparado com Vlaeminck *et al.* (2007) que obtiveram recuperação incompleta do processo, e atingiu eficiência média de apenas 23% na remoção de nitrogênio.



**Figura 03** – Acompanhamento das cargas de nitrogênio aplicadas e removidas.

Quando o reator apresentou por 25 dias estabilidade do processo (Fase 3), realizou-se progressão de carga por aumento de concentração, passando de  $100 \text{ mgN.L}^{-1}$  para  $200 \text{ mgN.L}^{-1}$  marcando assim o início da fase 4. Devido à progressão de carga, houve uma queda pouco



significativa na eficiência média de remoção de nitrogênio, passando de 54% para 52%. Contudo, o processo mantendo-se estável, permanecendo próximo da estequiometria proposta (figura 02 – fase 4).

Com base na análise dos resultados encontrados e os comparando com os apresentados na literatura, concluímos que tanto o método proposto para o armazenamento e conservação como o processo de reativação dos microrganismos ANAMMOX foi adequado, uma vez que se estabeleceu novamente o processo após 120 dias de armazenamento e 125 dias de reativação. Neste estudo, optou-se por um método de simples operação e fácil aplicação, demonstrando que a metodologia utilizada é uma excelente alternativa para preservação de culturas ANAMMOX, alcançando em até três meses a estabilidade do processo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APHA, AWWA & WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater. 19 ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2012.

Cho, S.; Takahashi, Y.; Fujii, N.; Yamada, Y.; Satoh, H.; Okabe, S.. Nitrogen removal performance and microbial community analysis of an anaerobic up-flow granular bed anammox reactor. *Chemosphere*, v.78, p.1129–1135, 2010.

Hommel, Norman G.; SAYAVEDRA-SOTO, Luis A.; ARP, Daniel J.. Chemolithoorganotrophic growth of *Nitrosomonas europaea* on fructose. *Journal of Bacteriology*. v. 185, n. 23, p. 6809-6814. 2003.

Jetten M. S. M. Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation ('anammox') process. *Environmental biotechnology*, v. 12, p. 283–288, 2001.

Kunz, A.; Higarachi, M. M.; Oliveira, P. A. V. Capítulo 4. Redução da carga poluente: A questão dos nutrientes, p.106. In: SEGANFREDO, M.A. Gestão ambiental na suinocultura. 1ªed. Brasília, DF. Embrapa Informação Tecnológica. 302p. 2007.

Rothrock MJ Jr, Vanotti MB, Szögi AA, Gonzalez MC, Fujii T. Long-term preservation of anammox bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*. Oct;92(1):147-57. 2011.

Scheeren. M.B., Airton Kunz, Ricardo L. R. Steinmetz & Valderi L. Dressler; O processo ANAMMOX como alternativa para tratamento de águas residuárias, contendo alta concentração de nitrogênio; *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*; v.15, n.12, p.1289–1297, 2011.

Strous, M.; Heijnen, J.J.; Kuenen, J.G.; Jetten, M.S.M.. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium – oxidizing microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, v50, p.589-596, 1998.

Vlaeminck Se, Geets J, Vervaeren H, Boon N, Verstraete W. Reactivation of aerobic and anaerobic ammonium oxidizers in OLAND biomass after long-term storage. *Appl Microbiol Biotechnol* 74:1376–1384, 2007.