

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**CARINE ROESE MORES**

**OPERAÇÃO E ACOMPANHAMENTO DE REATOR  
INOCULADO COM BACTÉRIAS ANAERÓBIAS  
OXIDADORAS DE AMÔNIO (ANAMMOX)**

**FLORIANÓPOLIS**

**2015**



Carine Roese Mores

**OPERAÇÃO E ACOMPANHAMENTO DE REATOR  
INOCULADO COM BACTÉRIAS ANAERÓBIAS  
OXIDADORAS DE AMÔNIO (ANAMMOX)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como exigência para obtenção do título de Bacharel, do curso de Ciências Biológicas, ministrado pela Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, sob orientação dos professores Geison de Souza Izídio e Airton Kunz.

Florianópolis

2015



Carine Roese Mores

**OPERAÇÃO E ACOMPANHAMENTO DE REATOR  
INOCULADO COM BACTÉRIAS ANAERÓBIAS  
OXIDADORAS DE AMÔNIO (ANAMMOX)**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado  
para obtenção do Título de Biólogo (a)

Banca Examinadora:

---

Presidente: Dr. Geison de Souza Izídio

---

Membro titular: Mra. Marina De Prá

---

Membro titular: Admir Giachini

---

Membro suplente: Marcelo Bortoli



A todos aqueles que de alguma  
forma contribuíra para com o  
meu crescimento pessoal e  
aqueles que estiveram comigo  
nessa caminhada



## AGRADECIMENTOS

Início agradecendo às pessoas mais importantes da minha vida, base de tudo! Meus pais, Arnaldo e Carien, e meu irmão Caio, que são meus exemplos e minha força maior. Sou muito grata por todo o amor e incentivo, por estarem presentes em todas as etapas que me trouxeram até aqui. Que bom que família não se escolhe, pois eu não poderia ter feito uma escolha melhor. Amo muito vocês!

Ao David, pelo amor, paciência e companheirismo ao longo desses anos.

Ao orientador Dr. Airton Kunz, pelo incentivo desde muito cedo à profissão, pela oportunidade de estágio no LEAA - Embrapa Suínos e Aves para realização deste trabalho e por todo conhecimento compartilhado durante esse tempo. Sou muito grata!

Ao professor orientador Dr. Geison de Souza Izídio, pela oportunidade de estágio dentro da UFSC, pela orientação e conselhos ao longo desse trajeto, pela sabedoria compartilhada, e por estar sempre disposto a ajudar!

Ao professor Dr. André de Ávila Ramos, por oportunizar meu primeiro estágio dentro da UFSC e estar sempre de portas abertas.

Ao professor coordenador de estágios, Dr. Carlos José de Carvalho Pinto, pela atenção, disposição e paciência para resolver o que fosse necessário para realização do meu estágio na Embrapa e minha formação. Agradeço imensamente!

Aos meus colegas e amigos da UFSC, pela parceria nesse tempo todo, vocês fizeram com que tudo fosse mais fácil e divertido, espero que esses nossos laços se perpetuem. Em especial às minhas amigas Fabiola e Luiza!

Aos colegas e amigos do LEAA, por terem me recebido tão bem e me ensinado tanta coisa em tão pouco

tempo. Em especial à Marina, por toda ajuda, paciência, parceria, e conhecimento compartilhado, muito obrigada!

À Embrapa Suínos e Aves, pela disponibilização do espaço físico e de materiais para que a realização deste fosse possível.

Em especial a Deus, por todas as oportunidades e pelas pessoas que permitiu cruzar meu caminho, só tenho a agradecer.

A todos, a minha gratidão!!!

*“Para onde quer que vá, vá de  
todo o coração”*

Confúcio



## RESUMO

O nitrogênio apresenta-se como um elemento essencial à vida. A maior parte deste encontra-se sob a forma de nitrogênio gasoso ( $N_2$ ), não estando diretamente disponível para biota terrestre. Este pode ser convertido à amônia, que pode ser assimilada por alguns organismos, ou então, oxidada a nitrito e, posteriormente a nitrato. Apesar da importância dessas formas nitrogenadas, estas, quando lançadas em grandes quantidades em corpos receptores naturais, podem causar impactos ambientais e danos à saúde humana e de outros animais. Essa elevada carga de compostos nitrogenados pode vir de efluentes gerados pelas indústrias, ou mesmo pelos gerados em locais de produção animal. Assim, diversos processos de remoção de nitrogênio vêm sendo estudados. Os processos biológicos têm sido preferencialmente adotados devido a um menor custo de operação. Processos biológicos convencionais de remoção de nitrogênio, entretanto, não são muito eficientes para efluentes com baixa relação C/N. Em 1995, foi descoberta a existência de microorganismos que possuem atividade ANAMMOX. O grande desafio desse processo é a obtenção de grande quantidade de biomassa, tendo em vista que esses microorganismos possuem um tempo de geração de 9 a 11 dias. O principal objetivo deste trabalho foi realizar a operação e monitoramento de um reator ANAMMOX visando produção de biomassa. O sistema experimental foi composto de um reator de fluxo ascendente e biomassa livre, sob condições controladas de temperatura ( $35^{\circ}C$ ). Este, foi alimentado com meio de cultura sintético, tendo sua concentração de nitrito e amônia de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  cada. O reator operou com progressiva baixa do tempo de retenção hidráulica, passando a remover maiores quantidades de nitrogênio, sem perder a eficiência do processo. Chegou-se a uma carga aplicada de  $5560 \text{ gN/L}^{-1}/\text{d}^{-1}$ , com respectiva carga removida de  $3850 \text{ gN/L}^{-1}/\text{d}^{-1}$ , operando com um TRH de 0,8h. Conclui-se que a redução do TRH é uma alternativa viável para progressão de carga neste tipo de reator, pois através dessa técnica obteve-se uma biomassa mais estável e com maior atividade.

**Palavras-chave:** Remoção de nitrogênio; progressão de carga; TRH.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Efeito do pH sobre as formas de nitrogênio amoniacal, amônia ( $\text{NH}_3$ ) e íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ).....23
- Figura 2 – Ciclo clássico do nitrogênio com os processos de fixação, nitrificação e desnitrificação.....24
- Figura 3 – Ciclo simplificado do nitrogênio com nitrificação, desnitrificação e ANAMMOX.....27
- Figura 4 – Árvore filogenética representando oito das nove espécies descritas de bactérias com atividade ANAMMOX.....29
- Figura 5 – Microscopia de transmissão de uma célula de *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*, evidenciando os três compartimentos citoplasmáticos.....30
- Figura 6 – Provável rota metabólica do processo ANAMMOX.....31
- Figura 7 – Sistema de um reator para cultivo de biomassa.....35
- Figura 8 – Gráfico de acompanhamento da entrada e saída de compostos nitrogenados no reator AMX.....42
- Figura 9 – Gráfico de acompanhamento das cargas de nitrogênio aplicado e removido no reator AMX.....44
- Figura 10 – Acompanhamento dos coeficientes estequiométricos do reator AMX.....45
- Figura 11 – Acompanhamento do aspecto da biomassa no reator AMX, nos dias 1, 20, 30 e 48 respectivamente.....46
- Figura 12 – Aspecto dos grânulos da biomassa durante o acompanhamento do reator.....46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Compostos nitrogenados e respectivos estados de oxidação.....	21
Tabela 2 – Composição média dos efluentes agropecuários de acordo com o tipo de animal.....	25
Tabela 3 – Composição do meio de cultura e solução de micronutrientes utilizados para o cultivo da biomassa ANAMMOX.....	37
Tabela 4 – Acompanhamento da redução do TRH no reator AMX.....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANAMMOX – Anaerobic Ammonium Oxidation

BOA – Bactérias Oxidadoras de Amônia

BON – Bactérias Oxidadoras de Nitrito

CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente

FIA – Flow Injection Analysis

LEAA – Laboratório de Experimentação e Análises Ambientais

N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> – Nitrogênio na forma de íon amônio

N-NH<sub>3</sub> – Nitrogênio na forma de íon amônia

N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> – Nitrogênio na forma de nitrito

N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> – Nitrogênio na forma de nitrato

N<sub>2</sub> – Nitrogênio Gasoso

NH<sub>3</sub> – Amônia

NH<sub>4</sub><sup>+</sup> – Íon Amônio

NO<sub>2</sub><sup>-</sup> – Nitrito

NO<sub>3</sub><sup>-</sup> – Nitrato

NT – Nitrogênio Total

TRH – Tempo de Retenção Hidráulica



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
1.1 O Nitrogênio e seu Ciclo Ambiental.....	21
1.2 Problema Ambiental do Nitrogênio.....	24
1.3 Remoção de Nitrogênio.....	26
1.3.1 Processos biológicos.....	26
1.3.1.1 Processo ANAMMOX.....	27
1.3.1.1.1 Microbiologia.....	29
1.3.1.1.2 Reatores.....	32
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>33</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
4.1 Reator.....	35
4.1.1 Tempo de Retenção Hidráulica (TRH).....	36
4.2 Meio de Cultura.....	36
4.3 Métodos analíticos.....	37
4.3.1 Nitrito.....	38
4.3.2 Nitrato.....	38

4.3.3 Nitrogênio Amoniacal.....	38
4.4 Eficiência de remoção de nitrogênio.....	39
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
5.3 Reator AMX.....	40
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>50</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>51</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 O Nitrogênio e seu Ciclo Ambiental

O nitrogênio é um elemento essencial para a vida, constituindo proteínas e ácidos nucleicos em células animais, vegetais e microbianas. A maior parte deste existe sob a forma de nitrogênio gasoso ( $N_2$ ), sendo o gás mais abundante da nossa atmosfera (79%) (BITTON, 2005). Outras formas predominantes são: nitrogênio orgânico, nitrogênio amoniacal ( $NH_3/NH_4^+$ ), nitrito ( $NO_2^-$ ) e nitrato ( $NO_3^-$ ) (ZHU *et al.*, 2008; CERVANTES *et al.*, 2009).

Os compostos nitrogenados se apresentam em estado de oxidação que podem variar das formas mais reduzidas ( $NH_3/NH_4^+$ ), até as mais oxidadas ( $HNO_3/NO_3^-$ ) (COSTA, 2013). A tabela 1 apresenta os diversos compostos nitrogenados conhecidos.

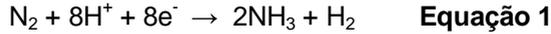
**Tabela 1 – Compostos nitrogenados e respectivos estados de oxidação.**

Composto	Fórmula	Estado de oxidação
Amônia/Amônio	$NH_3/NH_4^+$	-3
Nitrogênio orgânico	$NH_2$	-3
Hidrazina	$N_2H_{4(aq)}$	-2
Hidroxilamina	$NH_2O_{2(aq)}$	-1
Nitrogênio Gasoso	$N_{2(g)}$	0
Óxido nitroso	$N_2O_{(g)}$	+1
Óxido nítrico	$NO_{(g)}$	+2
Nitrito	$HNO/NO_2^-$	+3
Dióxido de nitrogênio	$NO_{2(g)}$	+4
Nitrato	$HNO_3/NO_3^-$	+5

Fonte: (MADIGAN *et al.*, 2010, adaptado).

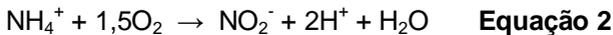
No ciclo ambiental do nitrogênio, o  $N_2$  não está diretamente disponível para a biota terrestre. Este se torna disponível para os produtores primários, como as plantas, apenas após sua conversão para amônia ( $NH_3$ ) por organismos procariotos, como bactérias e cianobactérias,

num processo denominado fixação do nitrogênio (BERNHARD, 2010), como apresentado na Equação 1.



Aproximadamente 85% da fixação do nitrogênio gasoso ocorre por processos biológicos. Outras formas de fixação podem ocorrer, como pela fertilização dos solos, queima de combustíveis fósseis e/ou via descargas elétricas na atmosfera (ABREU, 2013), constituindo apenas 15% da fixação total, visto que o  $\text{N}_2$  é uma molécula bastante estável.

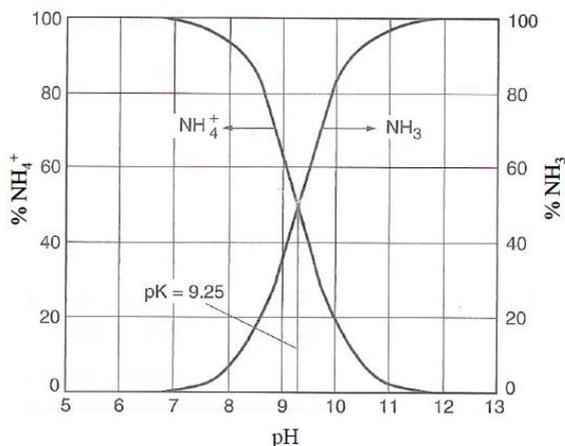
A amônia, por sua vez, pode ser assimilada pelos organismos fixadores e produtores primários, ou ainda oxidadas a nitrito e posteriormente a nitrato. A oxidação de amônia a nitrito (nitritação) é realizada pelas bactérias oxidadoras de amônia (BOA), principalmente pelas espécies pertencentes ao gênero *Nitrosomonas* (Equação 2). Já a oxidação de nitrito a nitrato (nitratação) é realizada pelas bactérias oxidadoras de nitrito (BON), principalmente pelas espécies que pertencem ao gênero *Nitrobacter* (Equação 3) (GERARDI, 2006; SCHMIDELL; SPILLER, 2005). A conversão amônia, a nitrito, e a nitrato é denominada nitrificação.



O processo de nitrificação ocorre em aerobiose, ou seja, o oxigênio é usado como aceptor de elétrons. As BOA e as BON são autótrofas e quimiolitotróficas, utilizando dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) como fonte de carbono, e oxidando compostos inorgânicos para obtenção de energia.

O nitrogênio amoniacal apresenta diferente conformação dependendo do pH e temperatura da solução aquosa em que se encontra. Como ilustrado na Figura 1, em pH básico o nitrogênio amoniacal predomina na forma de amônia ( $\text{NH}_3$ ), enquanto que em pH ácido, predomina na

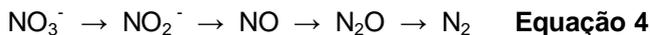
forma de íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) (METCALF, 2003). O equilíbrio das duas formas se estabelece num pH de 9,25.



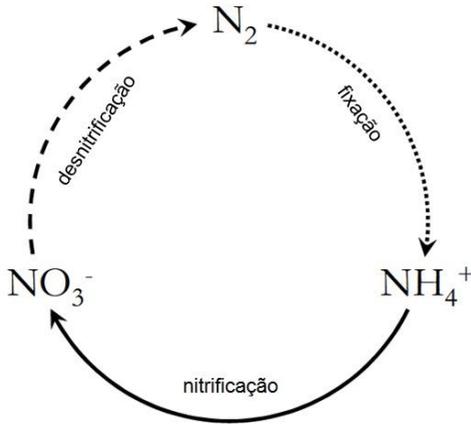
**Figura 1 – Efeito do pH sobre as formas de nitrogênio amoniacal, amônia ( $\text{NH}_3$ ) e íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ).**

Fonte: (METCALF; EDDY, 2003).

No processo de desnitrificação, o íon nitrato é convertido a nitrogênio gasoso pela atividade de bactérias heterotróficas que utilizam nitrito ou nitrato como acceptor de elétrons e matéria orgânica como fonte de carbono e energia. A desnitrificação ocorre em quatro estágios, como demonstrado na Equação 4 (BORTOLI, 2010), e é realizada por vários gêneros de bactérias, tais como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Spirillum*, *Acinetobacter*, *Thiobacillus*, dentre outros (BITTON, 2005).



Os processos de fixação, nitrificação e desnitrificação, que compreendem o ciclo do nitrogênio, estão representados simplificadaamente na figura 2.



**Figura 2 – Ciclo clássico do nitrogênio com os processos de fixação, nitrificação e desnitrificação.**

Fonte: (VAN DER STAR, 2008, adaptado).

## 1.2 Problema Ambiental do Nitrogênio

Os compostos nitrogenados podem ser extremamente nocivos ao meio ambiente quando lançados em altas concentrações em corpos receptores naturais. Elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal em corpos hídricos podem influenciar fortemente a dinâmica do oxigênio, diminuindo sua concentração dissolvida no meio, pois para oxidar 1 mg de  $NH_3$  são necessários 4,6 mg de  $O_2$  (BITTON, 2005). Esse processo acelera o fenômeno natural de eutrofização, causando desequilíbrio do ecossistema aquático. A amônia, pela sua toxicidade, mesmo em baixas concentrações, pode causar a morte de diversas espécies da comunidade aquática (METCALF; EDDY, 2003). Muitas espécies de peixes, por exemplo, não suportam concentrações acima de  $5\text{mg L}^{-1}$  (REIS & MENDONÇA, 2009).

Outro problema associado ao nitrogênio refere-se à saúde pública. Elevados teores de nitratos nas águas de abastecimento podem causar a metahemoglobinemia, conhecida como Síndrome do Bebê Azul. O nitrato é reduzido

a nitrito pelas bactérias do trato intestinal, e como consequência o  $Fe_2^+$  da hemoglobina é oxidado a  $Fe_3^+$ , formando a metahemoglobina, que é incapaz de se ligar ao  $O_2$ , impedindo trocas gasosas no organismo humano, além de causar danos à saúde de outros animais (ABREU, 2013; DE PRÁ, 2011). Além disso, o nitrito, quando ingerido, pode se combinar com aminas secundárias provenientes da dieta alimentar, formando nitrosaminas que apresentam poder mutagênico e carcinogênico (BITTON, 2005).

As fontes de nitrogênio em corpos naturais são diversas. Há altas concentrações de nitrogênio nos efluentes gerados por grande parte das indústrias, mas também nos locais de produção animal. Nesse contexto, a suinocultura é reconhecidamente uma atividade de grande potencial poluidor, por produzir grandes quantidades de resíduos com altas cargas de nutrientes, como fósforo e nitrogênio (Tabela 2). O modelo de produção atual, caracterizado pela criação intensiva e em confinamento, concentra grande número de animais em áreas reduzidas, o que aumenta ainda mais os riscos de contaminação ambiental (KUNZ *et al.*, 2005), sendo esse o principal desafio de manejo da atividade suinícola.

**Tabela 2 – Composição média dos efluentes agropecuários de acordo com o tipo de animal.**

Variáveis (kg dejetos/1000 kg de animal vivo)	Tipo de animal		
	Gado de leite	Gado de corte	Suíno
Dejetos totais	86,0	58,0	84,0
Sólidos totais	12,0	8,50	11,0
Sólidos voláteis	10,0	7,20	8,5
pH	7,0	7,0	7,5
N-NH <sub>3</sub>	0,079	0,086	0,29
P-Total	0,094	0,092	0,18

Fonte: (KUNZ *et al.*, 2008, adaptado).

A Resolução nº 430 de 2011 do CONAMA (Conselho Nacional de Meio Ambiente) estipula como limite de lançamento em corpos hídricos a concentração máxima de 20,0 mg L<sup>-1</sup> de nitrogênio amoniacal. Em virtude disso, são crescentes as exigências quanto aos critérios de manejo de dejetos, acarretando na necessidade da evolução nos processos de tratamentos de efluentes que conduzam a uma redução satisfatória na concentração de nutrientes (GRADY *et al.*, 1999), objetivando minimizar os impactos ambientais.

### 1.3 Remoção de Nitrogênio

Para a remoção do nitrogênio em efluentes industriais e agropecuários, podem-se utilizar basicamente processos físicos, químicos e biológicos (KUNZ *et al.*, 2009; VIVAN *et al.*, 2010). Entretanto, devido ao alto custo de tratamento por processos químicos e físicos, a remoção de compostos nitrogenados por sistemas biológicos tem sido amplamente estudados (ZHU *et al.*, 2008; METCALF & EDDY, 2003) e preferencialmente aplicados, pois atingem elevada eficiência na remoção de espécies nitrogenadas com baixo custo operacional quando comparados aos processos físico-químicos (EPA, 1993).

#### 1.3.1 Processos biológicos

Apesar de pouco difundida no Brasil, a estratégia biológica convencional para remoção de nitrogênio é a nitrificação/desnitrificação, baseada na nitrificação aeróbia autotrófica e posterior desnitrificação em uma etapa anóxica (na ausência de oxigênio, mas presença de nitritos e nitratos) e heterotrófica.

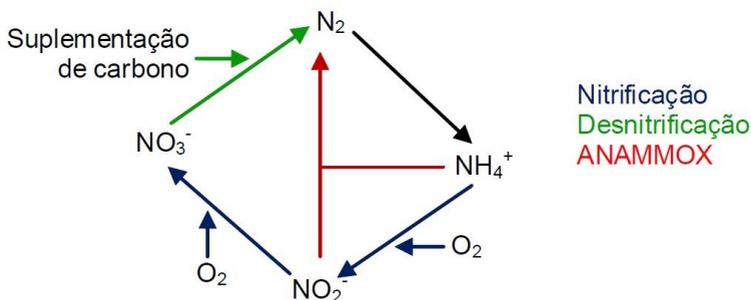
Na primeira etapa o íon amônio é oxidado pelo oxigênio a nitrito (Equação 2) e, posteriormente, a nitrato (Equação 3). Na segunda etapa o nitrito e o nitrato formados na etapa anterior são convertidos a nitrogênio gasoso (Equação 4). Este processo exige grande quantidade de oxigênio e de alcalinidade para completar o ciclo de remoção,

e é geralmente mais eficiente em águas residuais com baixas concentrações de nitrogênio (AHN, 2006).

Portanto, o sistema convencional apresenta dificuldades de operação, como limitação de carga removida, grande demanda de oxigênio para completar seu ciclo, e grande produção de lodo, conduzindo a uma busca por novos sistemas de remoção de nitrogênio.

### 1.3.1.1 Processo ANAMMOX

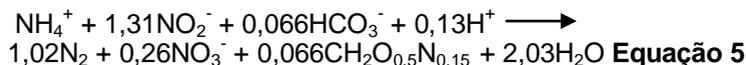
Há duas décadas, foi descoberto a existência de um novo segmento do ciclo do nitrogênio, conhecido como oxidação anaeróbia do amônio (ANAMMOX) (MULDER *et al.*, 1995). Nesse processo, o íon amônio é oxidado diretamente a nitrogênio gasoso, utilizando nitrito como acceptor final de elétrons (Figura 3).



**Figura 3 – Ciclo simplificado do nitrogênio com nitrificação, desnitrificação e ANAMMOX.**

Fonte: (SCHEEREN *et al.*, 2011).

Parte do nitrito é oxidada a nitrato, gerando equivalentes de redução para fixação do  $\text{CO}_2$  e consequente crescimento da biomassa. A estequiometria da reação está representada na equação 5 (STROUS *et al.*, 1998).



Análises genômicas mostraram que as bactérias responsáveis pela reação ANAMMOX formam um grupo monofilético que pertence ao filo *Planctomycetes* (STROUS *et al.*, 1999; SCHMID *et al.*, 2000). Estão inseridas na classe *Planctomyetia*, ordem *Candidatus Brocadiales* e família *Candidatus Brocadiaceae* (NBCI taxonomy, 2015), contendo cinco gêneros e mais de nove espécies descritas, oito delas representadas na Figura 4.

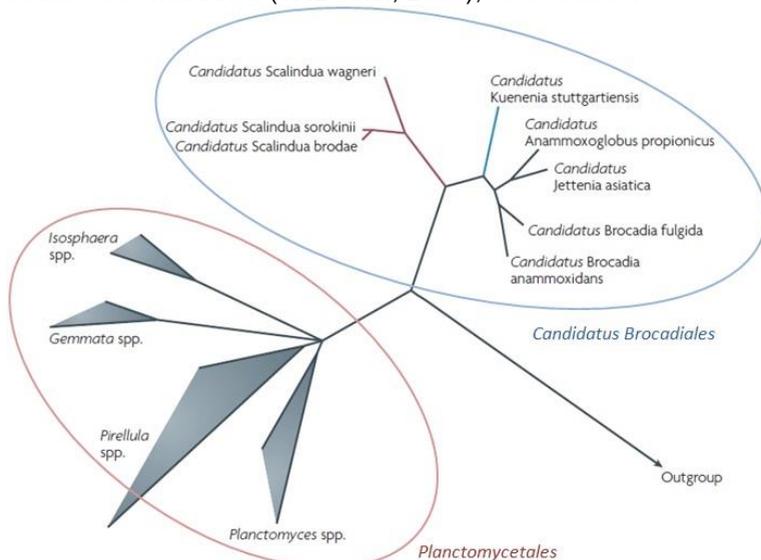
Algumas das espécies já descritas na literatura são *Candidatus Brocadia anammoxidans* (STROUS *et al.*, 1999), *Candidatus Brocadia fulgida* (KARTAL *et al.*, 2004), *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* (PENTON *et al.*, 2006) *Candidatus Anammoxoglobus propionicus* (KARTAL *et al.*, 2007), *Candidatus Scalindua brodae*, *Candidatus Scalindua wagneri*, *Candidatus Scalindua sorokinii* (SCHMID *et al.*, 2003) *Candidatus Jettenia asiatica* (QUAN *et al.*, 2008) e *Candidatus Scalindua arabica* (WOEBKEN *et al.*, 2008), que constituem um grupo com propriedades raras ou únicas.

Essas bactérias são anaeróbicas e quimiolitotróficas, e operam sob condições anóxicas. Possuem alta afinidade ao substrato (nitrito e amônio) e apresentam morfologia de cocos com diâmetro menor que 1µm (VAN NIFTRIK *et al.*, 2004), e tendência à formação de grânulos com uma coloração vermelha característica. Têm tempo de geração longo, variando de 9 a 11 dias (JETTEN, 2001), o que é bastante lento quando comparado a outras bactérias. Entretanto, com o constante melhoramento do processo esses números têm sido reduzidos, chegando em até 4,8 dias para duplicação (TANG *et al.*, 2010).

Quanto à atividade, elas apresentam temperatura ideal de 20 a 43°C, sendo a temperatura ótima entre 34 a 36°C, e sofrem inibição reversível na presença de oxigênio (STROUS *et al.*, 1998). Além disso, o pH ideal para o crescimento dessa microbiota está entre 7 e 8, com o ótimo próximo a 8.

Em diversas fontes tem-se detectado microrganismos com atividade ANAMMOX, como em lodos provenientes de

sistemas de tratamento de águas residuárias (DAPENA-MORA et al., 2004), efluentes de abatedouro (REGINATTO et al., 2005), ambientes de água doce (SCHUBERT et al., 2006), sedimentos marinhos (TAL et al., 2005), entre outros.



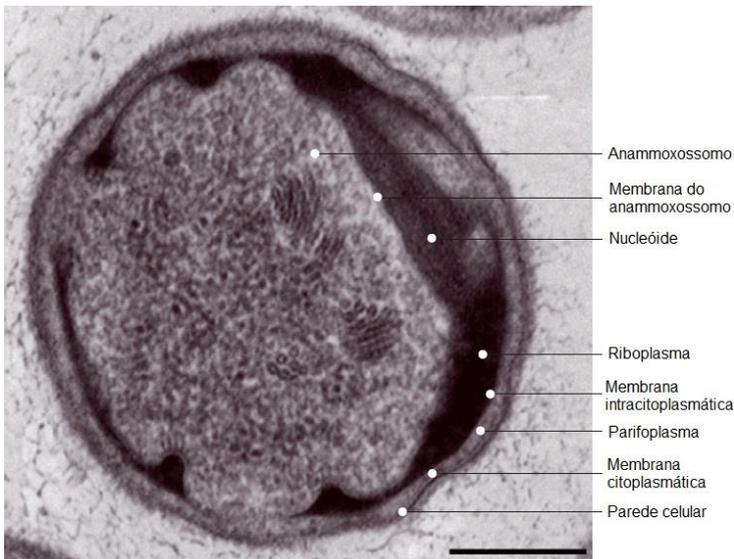
**Figura 4 – Árvore filogenética representando oito das nove espécies descritas de bactérias com atividade ANAMMOX.**

Fonte: (KUENEN, 2008, adaptado).

#### 1.3.1.1.1 Microbiologia

Os microrganismos do filo *Planctomycetes*, incluindo as bactérias ANAMMOX, possuem características distintas dos demais filos do domínio Bacteria, como a ausência de peptidoglicanos na parede celular, não podendo ser classificadas como gram-positivas ou gram-negativas, apresentando parede celular proteonácea, como as archeas (VIANCELLI, 2009). Além disso, eles possuem células compartimentalizadas, divididas em diferentes compartimentos membranáceos internos (FUERST, 2010).

A Figura 5 apresenta uma microscopia eletrônica de transmissão de uma bactéria ANAMMOX. Essas bactérias possuem três compartimentos celulares, sendo que o compartimento mais externo é denominado parifoplasma, envolto pela membrana citoplasmática (VAN NIFTRIK *et al.*, 2008). Já o segundo compartimento, denominado riboplasma, contém ribossomos e o nucleóide, e é circundado pela membrana intracitoplasmática. O compartimento mais interno é denominado anammoxossomo, contendo partículas de ferro e estruturas semelhantes a tubos (LINDSAY *et al.*, 2001).



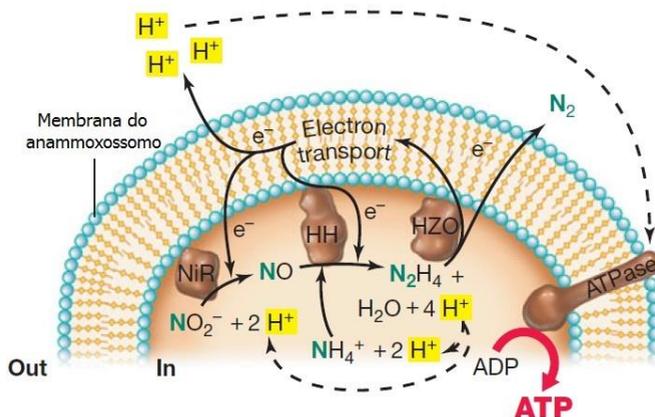
**Figura 5 – Microscopia de transmissão de uma célula de Candidatus *Kuenenia stuttgartiensis*, evidenciando os três compartimentos citoplasmáticos.**

Fonte: (KUENEN, 2008, adaptado).

A membrana do anammoxossomo apresenta lipídeos diferentes dos usualmente encontrados no domínio Bacteria. Ela é formada por ácidos graxos que contém vários anéis de ciclobutano (C<sub>4</sub>) ligados a gliceróis por ambas as ligações, estér e éter, denominados “*ladderane lipids*”, específicos de bactérias com atividade ANAMMOX (JETTEN *et al.*, 2009). Essa conformação forma uma membrana densa, que previne

a difusão de substâncias do anammoxossomo ao citoplasma (MADIGAN *et al.*, 2010), isso porque é nesse compartimento que a rota metabólica do processo ANAMMOX ocorre (FUERST, 2005; JETTEN *et al.*, 2009; MADIGAN *et al.*, 2010; KARLSSON *et al.*, 2014), e nessa rota, intermediários tóxicos são produzidos, como a hidrazina ( $N_2H_4$ ), que apresenta um grande potencial redutor.

A provável rota metabólica do processo ANAMMOX está ilustrada na Figura 6. Nela, o nitrito ( $NO_2^-$ ) é primeiramente reduzido a óxido nítrico (NO) pela enzima nitrito redutase. Subsequentemente, o óxido nítrico reage com a amônia ( $NH_3$ ), produzindo hidrazina ( $N_2H_4$ ) pela atividade da enzima hidrazina hidrolase. A hidrazina é então oxidada a nitrogênio gasoso ( $N_2$ ) e elétrons  $H^+$ , pela enzima hidrazina oxidoreductase, sendo que alguns dos elétrons gerados nessa etapa entram na cadeia transportadora de elétrons e geram uma força próton motriz e ATP pela ATPase, enquanto outros retornam ao sistema para alimentar o consumo de elétrons das etapas anteriores (JETTEN *et al.*, 2009; MADIGAN *et al.*, 2010).



**Figura 6 – Provável rota metabólica do processo ANAMMOX. NiR, nitrito redutase, HH, hidrazina hidrolase, HZO, hidrazina oxidoreductase.**

Fonte: (MADIGAN *et al.*, 2010, adaptado).

Além disso, grandes quantidades de citocromo C, pequenas proteínas heme responsáveis pela transferência de elétrons durante a reação, são encontradas dentro do anammoxossomo, suportando a teoria de que a rota metabólica ocorre no interior desse compartimento (KARLSSON, 2014).

#### 1.3.1.1.2 Reatores

Reatores em escala de bancada que operam com fluxo ascendente de meio de cultura e biomassa livre, têm se mostrado bastante eficientes para o cultivo e atividade dessas bactérias. Esses reatores em escala de bancada são utilizados para manutenção e crescimento de biomassa, além de servirem como pilotos para um reator em escala real. Experimentos que utilizam reatores em escala de bancada são úteis para testes que visam descobrir quais as melhores condições operacionais para esse tipo de biorreator, e são atualmente viáveis, pois requerem uma quantidade reduzida de biomassa. Dessa forma, reatores em escala de bancada servem como parâmetros para o desenvolvimento futuro de reatores em escala real, que requerem uma grande quantidade de biomassa para sua inoculação. Assim, faz-se necessária a operação desses reatores visando crescimento das bactérias ANAMMOX.

## 2 JUSTIFICATIVA

Desde sua descoberta, as bactérias ANAMMOX têm sido estudadas por diversos grupos de pesquisa espalhados pelo mundo. No Brasil, há alguns grupos trabalhando com bactérias ANAMMOX. Por exemplo, Schierholt Neto (2007) desenvolveram um biorreator que foi aclimatado com microrganismos anaeróbios oxidadores de amônio provenientes do fundo de uma lagoa experimental de um sistema de tratamento de dejetos de suíno, localizada na Unidade Demonstrativa (UD) da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, Brasil (VIANCELLI, 2009). A partir do dia 75 (19/12/2006) após a inoculação, o biorreator apresentou atividade ANAMMOX. Desde então, trabalhos e experimentos utilizando essas bactérias vêm sendo desenvolvidos no Laboratório de Experimentação e Análises Ambientais (LEAA) da Embrapa Suínos e Aves.

Devido ao longo tempo de geração dessas bactérias, o tempo de partida dos reatores também é longo, sendo necessário de três meses a mais de um ano de operação para obter uma cultura enriquecida e estabilizada (JETTEN, 1999; TOH, 2002). Além disso, ainda devido ao alto tempo de geração, um dos grandes desafios encontrados para se trabalhar com essas bactérias é a obtenção de uma grande quantidade de biomassa. Dessa forma, faz-se necessário o desenvolvimento e acompanhamento de biorreatores para manutenção e crescimento de biomassa em escala de bancada.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

O presente estudo teve como objetivo realizar a operação e monitoramento de um biorreator inoculado com bactérias anaeróbias oxidadoras de amônio, visando a produção e manutenção de biomassa.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Realizar progressão de carga por redução do tempo de retenção hidráulica (TRH) e avaliar o comportamento do reator quanto a eficiência do processo e ao aspecto da biomassa.

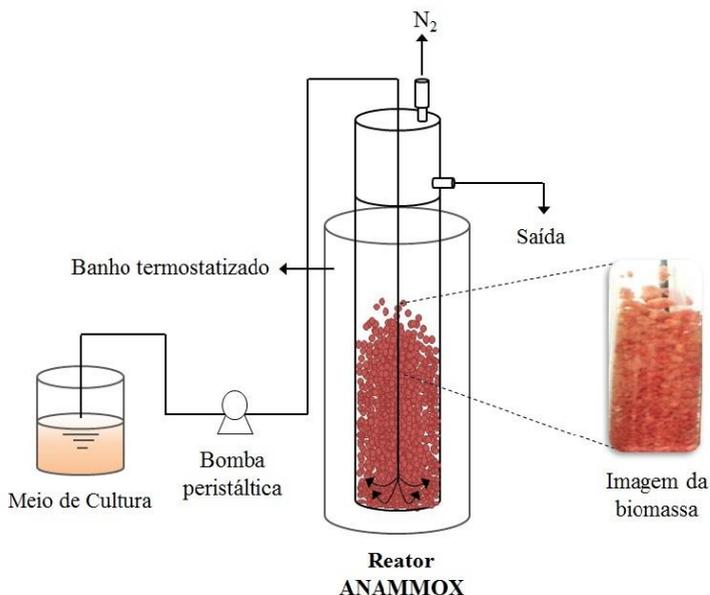
## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Experimentação e Análises Ambientais (LEAA) da Embrapa Suínos e Aves, unidade de Concórdia, SC.

### 4.1 Reator

O reator acompanhado (aqui denominado Reator AMX) operava em escala de bancada, anaerobiamente, com biomassa livre e fluxo ascendente com gradiente de concentração (pistonados).

A Figura 7 ilustra o esquema do sistema de um reator. Este é confeccionado de vidro, com conexões em PVC, e ficava imerso em um banho maria de acrílico com capacidade para 14 litros, equipado com aquecedor, termostato e uma bomba para homogeneização da água do banho, que se encontrava a uma temperatura de aproximadamente 35°C.



**Figura 7 – Sistema de um reator para cultivo de biomassa.**  
Fonte: (DE PRÁ, 2013, adaptado).

O reator era alimentado por uma bomba peristáltica e possuía um volume útil de 2,4 litros.

#### 4.1.1 Tempo de Retenção Hidráulica (TRH)

O tempo de retenção hidráulica é um parâmetro importante para o funcionamento do reator e atividade das bactérias ANAMMOX, e pode ser calculado segundo a vazão e volume do reator, conforme representado na equação 6. Para garantir o controle da redução do TRH, a vazão do reator foi aferida em todos os dias de acompanhamento.

$$TRH = \frac{V}{Q} \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

Q: Vazão em  $Ld^{-1}$  ;

V: Volume útil do reator em litros;

TRH: Tempo de Retenção Hidráulico em dias.

#### 4.2 Meio de Cultura

Para a manutenção da biomassa optou-se pela utilização de meio de cultura sintético com uma concentração de compostos nitrogenados variável. A Tabela 3 apresenta a composição do meio. Após a pesagem dos reagentes, os mesmos eram diluídos em frascos do tipo Bequer com a ajuda de agitadores magnéticos e posteriormente depositados em um recipiente com capacidade para 350 L e preenchidos com água destilada.

Objetivando evitar a contaminação por  $O_2$  nos reatores, borbulhava-se nitrogênio gasoso no recipiente que armazenava o meio de cultura, até obter-se uma concentração de oxigênio dissolvido inferior a  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ . A concentração de oxigênio no meio era aferida com o uso de um oxímetro. O procedimento era repetido sempre que era constatada uma contaminação por oxigênio ou quando da troca do meio de cultura.

**Tabela 3 – Composição do meio de cultura e solução de micronutrientes utilizados para o cultivo da biomassa ANAMMOX.**

Composto químico inorgânico	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	143
NaHCO <sub>3</sub>	420
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	27
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	9
EDTA	5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	240
NH <sub>4</sub> Cl	100
NaNO <sub>2</sub>	100
Solução de micronutrientes	0,3 mL L <sup>-1</sup>

Solução de micronutrientes	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )
ZnSO <sub>4</sub>	1247
MnSO <sub>4</sub>	1149
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	44
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ·14H <sub>2</sub> O	201
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	129
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	30
KCl	100
EDTA	975

Fonte: (MAGRI *et al.*, 2012, adaptado).

#### 4.3 Métodos analíticos

O acompanhamento do sistema foi realizado por análises físico-químicas das amostras coletadas nas entradas e saídas do reator, e essas foram realizadas duas vezes por semana, visando saber a concentração do meio de cultura que estava alimentando o sistema, e procedendo a avaliação da atividade ANAMMOX.

Os parâmetros utilizados para o monitoramento do processo foram quantidade de nitrogênio amoniacal, nitrito e nitrato.

#### 4.3.1 Nitrito

Na determinação de nitrito optou-se por utilizar o método colorimétrico em um sistema de análise por injeção em fluxo conforme APHA (1995), modificado segundo Schierholt Neto, *et al.* (2006).

Para realização da análise utilizou-se um Sistema Multicanal FIALab – 2500 com cabos de fibra ótica (SMA 200 mm) que ligam a célula de reação ao espectrofotômetro (Ocean-optics S2000 – escala ótica de 200 a 850 nm). Água destilada foi utilizada como carreador, e uma solução contendo sulfanilamina, ácido ortofosfórico e n-1-naftiletilenodiamina dihidracloroeto como reagente de cor.

#### 4.3.2 Nitrato

Na determinação de nitrato também se optou por utilizar o método colorimétrico em um sistema de análise por injeção em fluxo conforme APHA (1995), modificado segundo Schierholt Neto, *et al.* (2006).

O mesmo Sistema Multicanal FIALab foi utilizado para determinação do nitrato, com o mesmo reagente de cor. Entretanto, utilizou-se também uma coluna com aproximadamente 5g de cádmio para redução de nitrato a nitrito e uma solução de cloreto de amônio e EDTA sal dissódico como reagente tampão.

#### 4.3.3 Nitrogênio Amoniacal

A análise de nitrogênio amoniacal foi realizada com eletrodo de íon seletivo da marca Thermo segundo procedimento descrito por APHA (2012), pelo método potenciométrico, com alteração do volume de amostra para 20 mL. Seis gotas de hidróxido de sódio foram adicionadas a cada amostra para que todo nitrogênio amoniacal presente ( $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ ) fosse convertido à amônia ( $\text{NH}_3$ ) e pudesse então ser quantificado pelo eletrodo.

#### 4.4 Eficiência de remoção de nitrogênio

Com os dados obtidos a partir das análises das formas nitrogenadas, foi possível determinar a eficiência de remoção (em %), conforme Equação 7.

$$\eta = \frac{(C_N)_E - (C_N)_S}{(C_N)_E} \times 100$$

**Equação 7**

Onde:

$\eta$  = Eficiência (%)

$(C_N)_E$  = Concentração de nitrogênio na forma de amônio, nitrito e nitrato na entrada do reator ( $\text{mgN.L}^{-1}$ );

$(C_N)_S$  = Concentração de nitrogênio na forma de amônio, nitrito e nitrato na saída do reator ( $\text{mgN.L}^{-1}$ ).

## 5 RESULTADOS

O reator foi monitorado durante 65 dias e desde o início do acompanhamento já apresentava uma cultura de microrganismos enriquecida e estabilizada, com atividade ANAMMOX estabelecida.

### 5.1 Reator AMX

Durante o acompanhamento do reator AMX realizou-se uma progressão de carga por uma redução progressiva do tempo de retenção hidráulica, visando produção de biomassa e maior remoção de compostos nitrogenados. A Tabela 4 apresenta os dias em que o TRH foi alterado, e seu valor.

**Tabela 4 – Acompanhamento da redução do TRH no reator C.**

Fase	Período (dias)	TRH (h)
(I)	0 – 14	2,7
(II)	15 – 35	1,6
(III)	36 – 49	1,3
(IV)	50 – 59	1,0
(V)	60 – 65	0,8

Como pode ser observado na tabela 4, desde o primeiro dia de acompanhamento até o décimo quarto dia manteve-se o TRH em 2,7h. No 14º dia de operação, baixou-se o TRH para 1,6h, mantendo-o constante até o 35º dia. No 35º dia, reduziu-se novamente o TRH para 1,3h, não sendo alterado até o 49º dia. No 49º dia reduziu-se para 1,0h até o 59º dia, e neste dia, reduziu-se novamente, chegando a um TRH de 0,8h.

A concentração do meio de cultura foi mantida em 200 mg N.L<sup>-1</sup> de nitrogênio (sendo 100 mg N.L<sup>-1</sup> de nitrito e 100 mg N.L<sup>-1</sup> de amônio) durante todo o período de monitoramento.

A Figura 8 apresenta o desempenho do reator AMX quanto ao acompanhamento das concentrações das formas nitrogenadas (entrada de amônia ( $\text{N-NH}_3$ ) e nitrito ( $\text{N-NO}_2$ ), e saída de amônia, nitrito e nitrato ( $\text{N-NO}_3$ )). As linhas verticais representam os dias em que houve redução no TRH, dias 14, 35, 49 e 59, respectivamente. Os algarismos romanos representam as diferentes fases de avaliação ao longo do estudo.

Do primeiro dia de acompanhamento até o 30º dia, período que compreende a Fase I e parte da Fase II, a entrada de formas nitrogenadas manteve-se em torno de 170-200  $\text{mg NT.L}^{-1}$ , apresentando uma queda apenas no 22º dia (146  $\text{mg NT.L}^{-1}$ ). Já na Fase II, aproximadamente no 40º dia, houve um aumento na concentração de compostos nitrogenados circulantes, chegando a 240  $\text{mg NT.L}^{-1}$ , mantendo-se nessa faixa (240-220  $\text{mg NT.L}^{-1}$ ) até o 50º dia, já na Fase IV, a concentração na entrada do reator retornou a 200  $\text{mg NT.L}^{-1}$  e manteve-se assim até a Fase V.

Apesar dessas oscilações na entrada do reator, nota-se que a concentração de compostos nitrogenados na saída do reator apresentou-se quase que constante, mostrando menor taxa de remoção na Fase III, no 44º dia (saída de 65  $\text{mg NT.L}^{-1}$ ) e maior taxa de remoção na Fase IV, 56º dia (31  $\text{mg NT.L}^{-1}$ ).

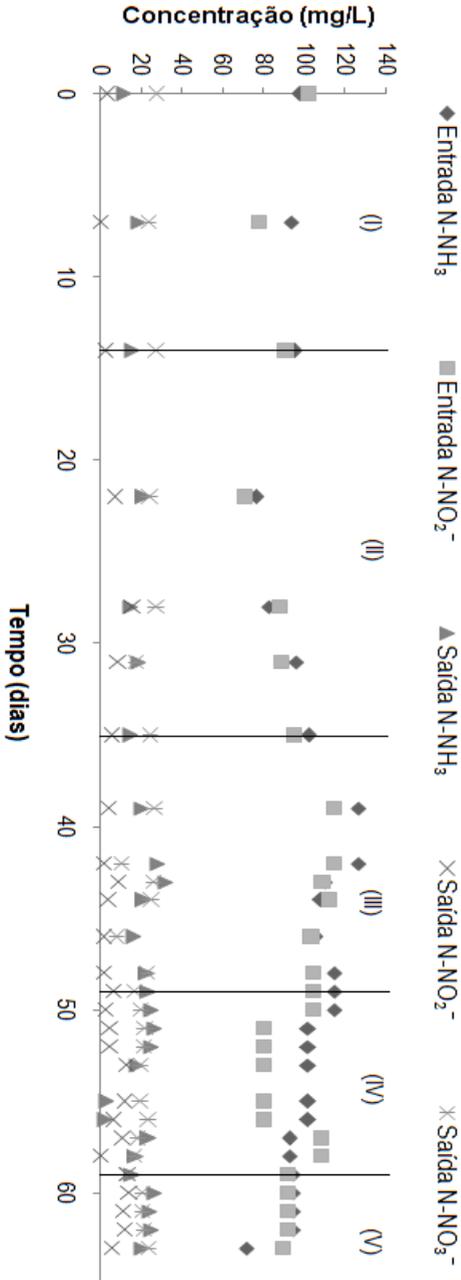


Figura 8 – Gráfico de acompanhamento da entrada e saída de compostos nitrogenados no reator AMX.

Na figura 9 pode-se observar o acompanhamento das cargas de nitrogênio aplicadas e removidas. Durante a Fase I a carga de nitrogênio na entrada do reator manteve-se em  $1600 \pm 100 \text{ gN/L}^{-1}/\text{d}^{-1}$ , com uma carga removida de  $1220 \pm 10 \text{ gN/L}^{-1}/\text{d}^{-1}$ , e sua eficiência manteve-se acima de 77%. Na Fase II, após o 22º dia de acompanhamento, a carga aplicada de nitrogênio aumentou, chegando a  $2400 \text{ gN/L}^{-1}/\text{d}^{-1}$  e a carga removida passou a  $1670 \text{ gN/L}^{-1}/\text{d}^{-1}$ , mantendo, dessa forma, uma eficiência de 77% de remoção de nitrogênio. No 28º dia, o reator apresentou uma pequena queda na eficiência, que passou a 70%, com uma carga aplicada de  $2600 \text{ gN/L}^{-1}/\text{d}^{-1}$  e carga removida de  $1790 \text{ gN/L}^{-1}/\text{d}^{-1}$ .

Na Fase III houve novamente uma redução do TRH, e uma maior carga de nitrogênio passou a ser aplicada ao reator, chegando a  $4520 \text{ gN/L}^{-1}/\text{d}^{-1}$  no 35º dia. O reator respondeu positivamente, apresentando uma carga removida respectiva de  $3630 \text{ gN/L}^{-1}/\text{d}^{-1}$ , conferindo uma remoção de 80% do nitrogênio aplicado. Após uma queda na carga de nitrogênio aplicada entre os dias 43 e 49, houve novamente um aumento de carga aplicada pela redução do TRH na Fase IV, chegando a  $5240 \text{ gN/L}^{-1}/\text{d}^{-1}$  no 50º dia de operação, com uma carga removida respectiva de  $4140 \text{ gN/L}^{-1}/\text{d}^{-1}$ , e conseqüente eficiência de 78%.

Ainda na Fase IV, entre os dias 51 e 59, a carga aplicada girou em torno de  $4350 \pm 500 \text{ gN/L}^{-1}/\text{d}^{-1}$ , e a eficiência manteve-se acima de 70%, chegando a 83% no 58º dia. Na Fase V, houve novamente uma redução do TRH, e no 60º dia registrou-se a maior carga de nitrogênio aplicada, chegando a  $5560 \text{ gN/L}^{-1}/\text{d}^{-1}$ , com uma carga removida de  $3850 \text{ gN/L}^{-1}/\text{d}^{-1}$ , conferindo uma eficiência de 70% de remoção de nitrogênio.

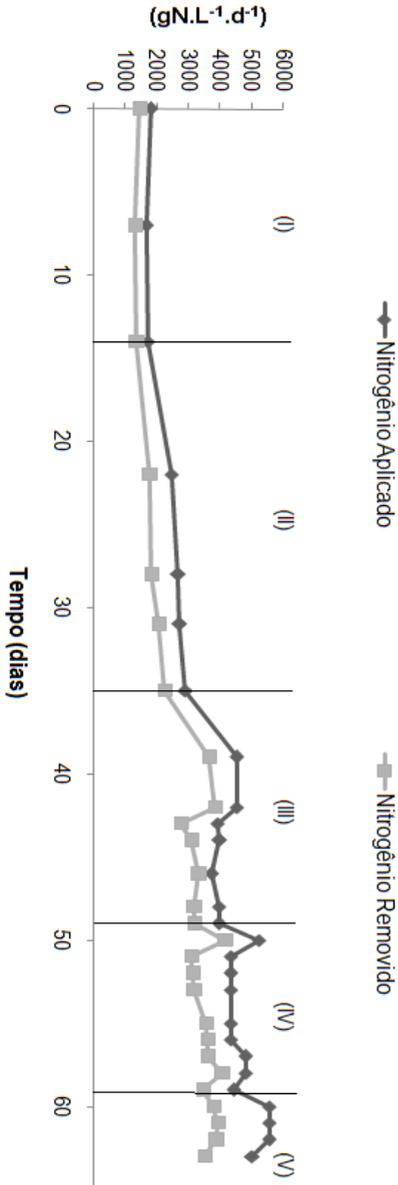
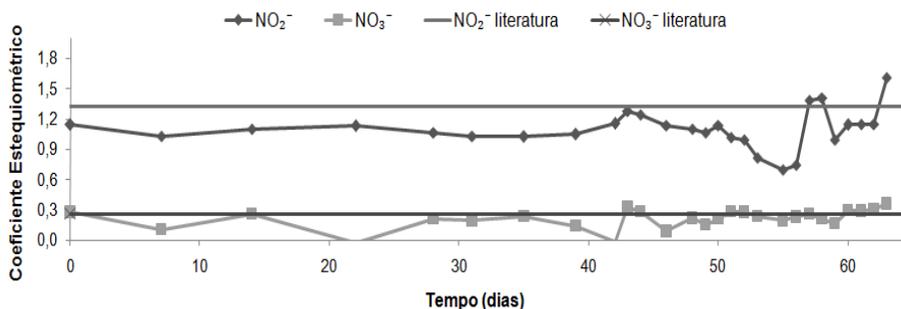


Figura 9 – Gráfico de acompanhamento das cargas de nitrogênio aplicado e removido no reator AMX.

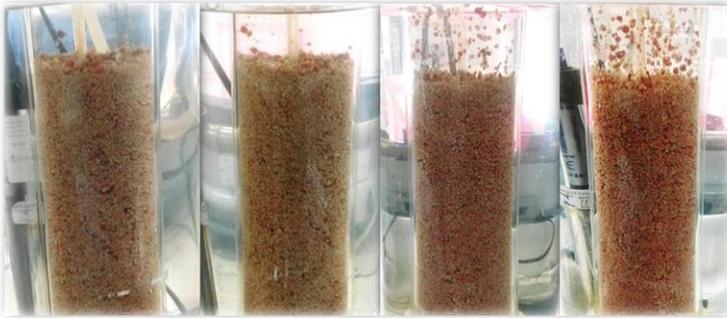
Além disso, foram calculados os coeficientes estequiométricos da reação e comparados com os encontrados na literatura (STROUS, 1998). A proximidade entre os resultados encontrados nesse estudo e com os da literatura (Figura 10), comprova a atividade ANAMMOX do reator.



**Figura 10 – Acompanhamento dos coeficientes estequiométricos do reator AMX.**

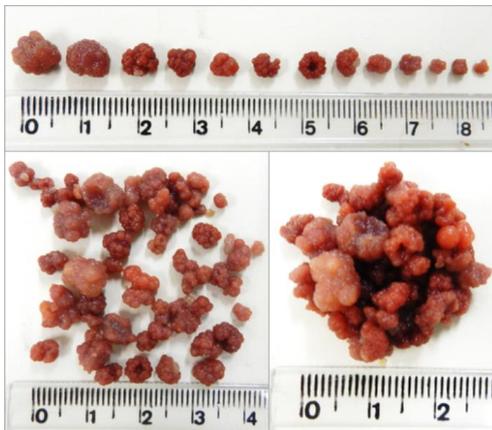
Também foi acompanhado o aspecto visual do reator. Com a constante redução do TRH, a biomassa apresentou uma evidente melhora na sua coloração, ficando mais avermelhada com o passar dos dias, como pode ser visualizado na Figura 11 (DE PRÁ *et al.*, 2015).

No primeiro dia de acompanhamento a biomassa apresentava uma coloração com tons amarelados, e ao final do acompanhamento pode-se observar uma coloração mais avermelhada, além de uma granulação mais intensa, com grânulos relativamente maiores.



**Figura 11 – Acompanhamento do aspecto da biomassa no reator AMX, nos dias 1, 20, 30 e 48 respectivamente.**

O tamanho dos grânulos durante o acompanhamento do reator pode ser visualizado na Figura 12. Os maiores registrados chegaram a um tamanho de aproximadamente 0,5 cm, e os menores com apenas poucos milímetros. Pode-se visualizar também a tendência de agrupamento dos grânulos.



**Figura 12 – Aspecto dos grânulos da biomassa durante o acompanhamento do reator.**

## 6 DISCUSSÃO

No que diz respeito ao desempenho do reator - visto que o processo ANAMMOX converte amônia e nitrito diretamente a nitrogênio gasoso, com uma pequena produção de nitrato - quanto mais baixas as concentrações de compostos nitrogenados na saída do reator, maior está sendo a eficiência do processo, pois conseqüentemente, uma maior quantidade de nitrogênio está sendo removida.

TANG *et al.* (2010) obtiveram um tempo de geração de 4,8 dias para bactérias ANAMMOX em um reator operando com um baixo tempo de retenção hidráulica. Objetivando um menor tempo de duplicação e conseqüente maior produção de biomassa, realizou-se uma progressão de carga pela redução do TRH. Para que não houvesse um choque de cargas, o TRH do reator foi sendo reduzido progressivamente durante os 60 dias de acompanhamento.

Pode-se notar, pelo acompanhamento dos gráficos apresentados, que com a constante redução do tempo de retenção hidráulica, a carga de nitrogênio aplicada no reator aumentou. Muitas vezes, esse aumento pode causar um choque de carga e diminuir significativamente a eficiência do reator, tendo em vista que altas concentrações de nitrito, por exemplo, são inibidoras do processo ANAMMOX (STROUS *et al.*, 1999).

As concentrações em que os compostos nitrogenados causam inibição da atividade das bactérias ANAMMOX variam conforme os estudos, porque dependem de fatores operacionais do reator, e também das espécies presentes no reator (CASAGRANDE, 2011). Dapena Mora *et al.* (2007) estimaram a concentração de inibição de 50% da atividade ANAMMOX, para amônia, nitrito e nitrato. Dentre as formas estudadas, o nitrito causou maior efeito inibitório sobre o processo ( $350 \text{ mgN.L}^{-1}$ ). Ainda, Schierholt Neto (2007), trabalhando com reator de bancada com fluxo ascendente, observou início de inibição do processo por nitrito a uma concentração de  $140 \text{ mgN-NO}_2^{\cdot-} .\text{L}^{-1}$ , o que reflete uma inibição ainda maior do processo por nitrito.

De Prá (2013), relatou em seu estudo que concentrações superiores a  $100 \text{ mgN-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$  tendem a reduzir a atividade das bactérias ANAMMOX e limitar a velocidade de consumo de substrato.

No presente estudo, o aumento progressivo da carga aplicada não inibiu em nenhum momento a atividade das bactérias ANAMMOX. Além disso, pode-se observar uma resposta positiva do reator quando ao aumento de carga, pois o mesmo operou durante os 60 dias com uma eficiência de remoção de nitrogênio superior a 70%.

O processo ANAMMOX tem como característica a remoção de altas cargas de nitrogênio quando comparado aos processos convencionais, como nitrificação/desnitrificação. Isso deve-se a alta velocidade de consumo do nutriente, que é cerca de sete vezes maior que o processo convencional. Casagrande (2011) atingiu elevadas cargas de remoção de nitrogênio, chegando a atingir uma remoção 43 vezes maior sob o processo convencional de nitrificação, o que mostra a elevada eficiência do processo ANAMMOX.

Bortoli (2010) trabalhou com o processo convencional de nitrificação e obteve uma carga máxima aplicada de  $410 \text{ gN/L}^{-1}/\text{d}^{-1}$ . Nesse estudo, chegou-se a uma carga aplicada máxima de  $5560 \text{ gN/L}^{-1}/\text{d}^{-1}$ . Quando da comparação dos dados, percebe-se que esse processo foi capaz de suportar 13 vezes mais nitrogênio aplicado por dia.

Quanto ao acompanhamento visual do reator, este apresentou evidente mudança na coloração e tamanho dos grânulos das bactérias. Fato que deve-se provavelmente à maior quantidade de meio de cultura circulante. Quando há redução do TRH, e conseqüente aumento da vazão, uma maior quantidade de meio de cultura circula pelo reator. Dessa forma, o metabolismo celular das bactérias ANAMMOX aumenta, fazendo com que a biomassa apresente uma coloração mais avermelhada com granulação mais intensa.

O anammoxossomo, organela hipoteticamente responsável pela produção de energia e pela rota metabólica das bactérias ANAMMOX contém grandes quantidades de citocromo C - pequenas proteínas heme responsáveis pelo transporte de elétrons (KARLSSON, 2014). Quando o ferro liga-se ao citocromo C, para transporte de elétrons, ele é oxidado produzindo uma coloração mais avermelhada.

Com o aumento de carga no reator por redução do TRH, havia mais meio de cultura circulando no reator em um menor período de tempo e, portanto, havia mais ferro circulante, tendo em vista que este elemento está presente no meio. Com o aumento do metabolismo celular desses microrganismos, maiores quantidades de citocromo C são produzidas, para que haja um efetivo transporte de elétrons. Dessa forma, pode-se observar claramente a elevação do metabolismo celular e conseqüente melhora na coloração da biomassa ANAMMOX.

A grande resistência encontrada no reator, que não perdeu eficiência em nenhum momento do acompanhamento, pode dever-se ao tamanho dos grânulos das bactérias. As bactérias ANAMMOX têm tendência à formação de grânulos pela excreção de uma matriz de polímeros extracelulares (ECPs), compostos principalmente por polissacarídeos e proteínas (LU, 2012). Tang *et al.* (2010), discutem que a formação de grânulos é um fator determinante na melhoria da eficiência do reator. Strous *et al.* (1998) relataram diâmetros agregados menores que 50  $\mu\text{m}$ . Nesse estudo, os grânulos apresentavam tamanho em milímetros, o que pode ter aumentado a resistência do processo.

## 7 CONCLUSÕES

O tempo de acompanhamento do reator não foi suficiente para verificar se o tempo de duplicação das bactérias efetivamente reduziu, como em resultados obtidos em estudos anteriores na literatura. Entretanto a progressão de carga por redução do tempo de retenção hidráulica aparenta ser uma técnica aplicável. Obteve-se uma melhora no aspecto da biomassa, que reflete a maior atividade dessas bactérias.

Obteve-se também uma biomassa mais estável quanto ao tamanho dos grânulos e sua resistência. A biomassa manteve sua atividade mesmo com altas concentrações de compostos nitrogenados circulantes no reator e não apresentou significativa queda de eficiência de em nenhuma fase do acompanhamento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, A. S. **Remoção de nitrogênio de efluentes industriais e novas alternativas de tratamento.** Trabalho de diplomação em Engenharia Química, UFRGS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2013.

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

APHA. **Standart Methods - For the examination of water and wastewater.** 1995.

BERNHARD, A. **The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact.** Nature Education Knowledge. 2010.

BITTON, G. **Wastewater microbiology.** New Jersey: Ed. John Wiley & Sons. 2005.

BORTOLI, M. **Partida, operação e otimização de um sistema de nitrificação/desnitrificação visando à remoção de nitrogênio de efluente da suinocultura pelo processo Ludzack-Ettinger modificado.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), UFSC, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2010.

CASAGRANDE, C. G. **Operação de reatores com atividade anammox visando remoção de altas cargas de nitrogênio.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), UFSC, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2011.

CERVANTES, F.J. **Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution.** London, NY: IWA Publishing. 2009.

CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente. **Resolução Nº 430.** 2011.

COSTA, M. C. S. **Impacto do tipo de inóculo e das condições operacionais sobre a estrutura da comunidade bacteriana e desempenho do processo anammox em biofiltros usando espuma de poliuretano como meio**

**suporte dos microorganismos.** Tese (Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos), UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2013.

DAPENA-MORA, A., VAN HULLE, S. W. H., CAMPOS, L. J., MÉNDES, R., VANROLLEGHEM, P.A., JETTEN, M. **Enrichment of Anammox biomass from municipal activated sludge: experimental and modelling results.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 2004.

DAPENA-MORA, A., FERNÁNDEZ, I., CAMPOSA, J. L., MOSQUERA-CORRAL, A., MÉNDES, R., JETTEN, M. S. M. **Evaluation of activity and inhibition effects on Anammox process by batch tests based on the nitrogen gas production.** Enzyme and Microbial Technology. 2007.

DE PRÁ, M. C. **Partida, operação e estabelecimento do processo de nitrificação parcial em um reator *airlift* com remoção simultânea de carbono e SST em efluente da suinocultura.** Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia Ambiental, UnC, Universidade do Contestado, Concórdia. 2011.

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

DE PRÁ, M. C., KUNZ, A., SCUSSIATO, L. A., DIAS, J. R., MORES, C. R., JACINTO, I. C., SOARES, H. M. **Influence of increasing nitrogen loading rate on the performance of ANAMMOX column reactor with granular sludge.** Submetido ao Congresso Mundial de digestão anaeróbia. No prelo. 2015.

EPA. **Nitrogen control.** Washington, DC. 1993.

FUERST, J. A. **Intracellular compartmentation in planctomycetes.** Annu Rev Microbiol. 2005.

FUERST, J. A. **Planctomycetes challenge our concept of the bacterial cell and of a prokaryote as a cell structure type, as well as our ideas about origins of the eukaryote nucleus.** Nature Education. 2010.

FUX, C. **Biological nitrogen elimination of ammonium-rich sludge digester liquids.** Ph.D. thesis, ETH, Zurich, Switzerland. 2003.

GERARDI, M. H. **Wastewater Bacteria.** Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. 2006.

GRADY, C. P. L. Jr., DAIGGER, G. T., LIM, C. H. **Biological Wastewater Treatment.** New York: Ed. Marcel Dekker. 1999.

JETTEN M. S. M. **Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation ('anammox') process.** Environmental biotechnology. 2001.

JETTEN, M. S. M., STROUS, M. VAN DE PAS, K. T., VAN DONGEN U. G., KUENEN J. G. **The anaerobic oxidation of ammonium.** FEMS microbiology reviews. 1999.

JETTEN, M. S. M., VAN NIFTRIK, L., STROUS, M., KARTAL, B., KELTJENS, J. T., OP DEN CAMP, H. J. **Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria.** Crit Rev Biochem Mol Biol. 2009.

KARLSSON, R., KARLSSON, A., BACKMAN, O., JOHANSSON, B. R., HULTH, S. **Subcellular localization of an ATPase in anammox bacteria using proteomics and immunogold electron microscopy.** FEMS Microbiol Lett. 2014.

KARTAL, B., RATTRAY, J., NIFTRIK, L. A. VAN., VOSENBERG, J. VAN DE., SCHMID, M. C., WEBB, R. I., SCHOUTEN, S., FUERST, J. A., DAMSTE, J. S., JETTEN, M. S. M., STROUS, M. **Candidatus "Anammoxoglobus**

**propionicus” a new propionate oxidizing species of anaerobic oxidizing bacteria.** Syst and Appl Microbiol. 2003.

KARTAL, B., VAN NIFTRIK, L., SLIEKERS, O., SCHMID, M.C., SCHMIDT, I., VAN DE PAS-SCHOONEN, K., CIRPUS, I., VAN DER STAR, W., VAN LOOSDRECHT, M., ABMA, W. **Application, ecophysiology and biodiversity of anaerobic ammonium oxidizing bacteria.** Rev. Environ. Sci. Biol. Technol. 2004.

KUENEN, J. G. **Anammox bacteria: from discovery to application.** Nature Reviews Microbiology. 2008.

KUNZ, A., BORTOLI, M. HIGARASHI, M. M. **Avaliação do manejo de diferentes substratos para compostagem de dejetos líquidos de suínos.** Acta Ambiental Catarinense. 2008.

KUNZ, A., HIGARASHI, M. M., OLIVEIRA, P. A. **Tecnologias de manejo e tratamento de dejetos de suínos estudadas no Brasil.** Cadernos de Ciência e Tecnologia – EMBRAPA. 2005.

KUNZ, A., MIELE, M., STEINMETZ, R. L. R. **Advanced swine manure treatment and utilization in Brazil.** Bioresource Technology. 2009.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M. **Princípios de bioquímica.** São Paulo: Sarvier. 2002.

LINDSAY, M. R., R. I. WEBB, M. STROUS, M. S. M. JETTEN, M. K. BUTLER, R. J. FORDE, e J. A. FUERST. **Cell compartmentalisation in planctomycetes: novel types of structural organisation for the bacterial cell.** Arch. Microbiol. 2001.

LU *et al.* **The structure, density and settability of anammox granular sludge in high-rate reactors.** Elsevier Journal. 2012.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., DUNLAP, P. V., CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., STAHL, D. A., CLARK, D. P. **Brock Biology of Microorganisms**. Pearson Benjamin-Cummings, San Francisco. 2010.

MAGRÍ, A., VANOTTI, M. B., SZÖGI, A. A., CANTRELL, K. B. **Partial Nitrification of Swine Wastewater in View of its Coupling with the ANAMMOX Process**. Journal of Environmental Quality. 2012.

METCALF & EDDY. **Wastewater Engineering: Treatment and reuse**. New York, USA: McGraw Hill. 2003.

MULDER, A., VAN DE GRAAF, A. A., ROBERTSON, L. A., KUENEN J. G. **Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized reactor**. FEMS Microbiol. Ecol. 1995.

NCBI Taxonomy. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=203683&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock>>. Acesso em: 15 de out. 2015.

PENTON, C. R., DEVOL, A. H., TIEDJE, J. M. **Molecular Evidence for the Broad Distribution of Anaerobic Ammonium-Oxidizing Bacteria in Freshwater and Marine Sediments**. Appl. Environ. Microbiol. 2006.

QUAN, Z., RHEE, S., ZUO, J., YANG, Y., BAE, J., PARK, J. R., LEE, S., PARK, Y. **Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-oxidizing (ANAMMOX) reactor**. Environ. Microbiol. 2008.

REGINATTO V., TEIXEIRA, R. M., PEREIRA, F., SCHMIDELL, W., FURIGO, A. J., MENES, R., ETCHEBEHERE, C., SOARES, H. M. **Anaerobic ammonium oxidation in a bioreactor treating slaughterhouse wastewater**. Brazilian Journal of Chemical Engineering. 2005.

REIS, J. A. T., MENDONÇA, A. S. F. **Análise técnica dos novos padrões brasileiros para amônia em efluentes e corpos d'água.** Artigo técnico Engenharia Sanitária e Ambiental. 2009.

SCHEEREN, M. A., KUNZ, A., STEINMETZ, R. L. R., DRESSLER, V. L. **O processo ANAMMOX como alternativa para tratamento de águas residuárias, contendo alta concentração de nitrogênio.** Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental. 2011.

SCHIERHOLT NETO, G. F. **Desenvolvimento de uma Flora de Microrganismos Oxidadores Anaeróbios De Amônia Utilizando Inóculos Provenientes De Dejeito De Suíno.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), UFSC, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2007.

SCHIERHOLT NETO, G. F., KUNZ, A., HIGARASHI, M. M., MATTEI, R. M., MENOZZO, G. F. **Análise por injeção em fluxo para determinação de nitrato e nitrito em amostras de águas e dejetos de animais.** XI Encontro Nacional sobre Metodologias de Laboratório da Embrapa - ANAIS - Documentos 112. Concórdia: EMBRAPA. 2006.

SCHMID, I., SLIEKERS, O., SCHMID, M., BOCK, E., FUERST, J. A., KUENEN, J. G., JETTEN, M. S. M., STROUS, M. **New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater.** FEMS Microbiol. 2003.

SCHMID, M., TWACHTMANN, U., KLEIN, M., STROUS, M., JURETSCHKO, S., JETTEN, M. S. M., METZGER, J., SCHLEIFER, K. H., WAGNER M. **Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation.** Syst Appl Microbiol. 2000.

SCHMIDELL, W., SPILLER, A. R. **Remoção de Nitrogênio.** V Curso de Tratamento Biológico de Resíduos. Florianópolis. 2005.

SCHUBERT, C.J., DURISCH-KAISER, E., WEHRLI, B., THAMDRUP, B., LAM, P., KUYPERS, M. M. M. **Anaerobic ammonium oxidation in a tropical freshwater system (Lake Tanganyika)**. Environmental Microbiology. 2006.

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. 1998.

STROUS, M., FUERST J., KRAMER, E., LOGEMANN, S., MUYZER, G., PASSCHOONEN, K. T. VAN DE, WEEB, R., KUENEN, J. G., JETTEN M. S. M. **Missing lithotroph identified as new planctomycete**. Nature. 1999.

TAL, Y., WATTS, J. E. M., SCHREIER, H. J. **Anaerobic Ammonia- Oxidizing Bacteria and Related Activity in Baltimore Inner Harbor Sediment**. Applied and environmental microbiology. 2005.

TANG, C. J., ZHENG, P., WANG, C. H., MAHMOOD, Q., ZHANG, J. Q., CHEN, X. G.; ZHANG, L., CHEN, J. W. **Performance of high-loaded ANAMMOX UASB reactors containing granular sludge**. Elsevier Journal. 2010.

TOH, S. K., WEBB, R.I., ASHBOLT, N.J. **Enrichment of autotrophic anaerobic ammonium-oxidizing consortia from various wastewaters**. Microbial ecology. 2002.

VAN DER STAR, W. R. L. **Growth and Metabolism of Anammox Bacteria**. Technische Universiteit Delft en gefinancierd door technologiestichting STW. 2008.

VAN NIFTRIK, L. A., FUERST, J. A, SINNINGHE, J. S., KUENEN, J. G., JETTEN, M. S., STROUS, M. **The anammoxosome: an intracytoplasmic compartment in anammox bacteria**. FEMS Microbiology Letters. 2004.

VAN NIFTRIK, L., GEERTS, W. J. C., VAN DONSELAAR, E. G., HUMBEL, B. M., WEBB, R. I. FUERST, J.A., VERKLEIJ, A. J., JETTEN, M. S. M., STROUS, M. **Linking Ultrastructure**

**and Function in Four Genera of Anaerobic Ammonium-Oxidizing Bacteria: Cell Plan, Glycogen Storage, and Localization of Cytochrome c Proteins.** Journal of Bacteriology. 2008.

VIANCELLI, A. **Caracterização e análise filogenética de ANAMMOX: uma bactéria chave no ciclo do nitrogênio.** Dissertação (Programa de pós graduação em Ecologia), UFSC, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2009.

VIVIAN, M., KUNZ, A., STOLBERG, J., PERDOMO, C., TECHIO, V. H. **Eficiência da interação biodigestor e lagoas de estabilização na remoção de poluentes em dejetos de suínos.** Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental. 2010.

WETT, B. **Development and implementation of a robust deammonification process.** Water Science and Technology. 2007.

ZHU, G., PENG, Y., LI, B., GUO, J., YANG, Q. WANG, S. **Biological Removal of Nitrogen from Wastewater.** Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. 2008.