

# REMOÇÃO DE AZOTO NUM REACTOR DESCONTINUO SEQUENCIAL DE BIOFILME COM AREJAMENTO INTERMITENTE DE ELEVADA FREQUÊNCIA

Madalena VIEIRA, António G. BRITO, Cláudia ALVES, Denise SILVA,  
Zenaide ANDRADE, Regina NOGUEIRA<sup>(1)</sup>.

Palavras chave: *biofilme, remoção de azoto, reactor sequencial descontínuo, arejamento intermitente.*

## INTRODUÇÃO

A descarga de azoto em meios hídricos superficiais constitui um dos principais problemas com que, reconhecidamente, as entidades gestoras de sistemas de saneamento de águas residuais se deparam em Portugal. Neste quadro, o reactor descontínuo sequencial - denominado SBR do acrónimo *Sequencing Batch Reactors* - tem um potencial interessante para a eliminação de compostos azotados comparativamente com o processo convencional de lamas activadas. É um processo de carga repetida, constituído por diversas fases sequenciais (enchimento, reacção, sedimentação e descarga), dispensando o decantador secundário e a recirculação de lamas. A possibilidade de variação do tempo de cada uma das fases confere uma flexibilidade considerável aos diversos processos de tratamento de águas residuais (Artan et al., 2005).

O reactor SBR torna-se particularmente interessantes na variante com biofilme (SBBR - *Sequencing Batch Biofilm Reactor*), uma vez que o crescimento microbiano na interface sólido/líquido do suporte maximiza a retenção de biomassa com uma taxa específica de crescimento baixa, que de outro modo seria arrastada do sistema. Esta particularidade confere uma robustez acrescida aos sistemas de remoção de azoto, uma vez que a nitrificação fica claramente beneficiada com a acumulação de biomassa autotrófica no reactor.

O controlo dos processos de nitrificação/desnitrificação é, em regra, exercido de forma expedita através da variável tempo, ou seja, a duração das fases anóxicas e aeróbias é ajustada pela temporização do arejamento (Rodrigues et al., 2001). Períodos prolongados de arejamento permitem a remoção total de carbono, pela biomassa heterotrófica, e também beneficiam a capacidade de nitrificação do sistema. No entanto, afectam negativamente o processo subsequente de desnitrificação, durante os períodos anóxicos, exigindo em muitos casos a adição de uma fonte externa de carbono, constituindo assim um custo acrescido de operação (Luostarienen et al., 2006). Existe, assim, um compromisso entre a extensão dos períodos aeróbios e anóxicos que maximiza a remoção de azoto. Alguns autores reconheceram as vantagens do fornecimento de oxigénio por oscilação de elevada frequência (HFO) em sistemas com remoção de azoto com o objectivo de otimizar o processo de nitrificação e desnitrificação simultânea (SND) (Villaverde et al., 2000; Yoo et al., 1999, Insel et al., 2006; Luostarienen et al., 2006).

Neste contexto, o presente trabalho visou a optimização da remoção de azoto num SBBR com alimentação contínua, através do fornecimento de oxigénio de modo intermitente.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Descrição do reactor e condições de operação

O reactor descontínuo sequencial de biofilme (SBBR, Figura 1), com um volume total de 28 L, operou, à temperatura ambiente ( $\approx 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), com alimentação contínua em ciclos de 300 min, compostos por duas fases sequenciais: a fase de reacção (260 min) e a fase de descarga (20 min). O volume de líquido descarregado, em cada ciclo, correspondeu a 48 % do volume total do reactor e o tempo de retenção hidráulico foi de 9.2 h. O suporte utilizado para a formação do biofilme é de polietileno, tem de altura 10 mm e 30 de diâmetro e tem uma área específica de  $407\text{ m}^2/\text{m}^3$ . No arranque, o reactor foi inoculado com biofilme, proveniente de um trabalho anterior (Alves et al., 2005), perfazendo este cerca de 47 % do volume total do reactor. O arejamento foi executado de forma intermitente, tendo-se variado a duração dos períodos arejados e não arejados (Figura 2). O controlo da operação foi

(1) Universidade do Minho, Centro de Engenharia Biológica - Campus de Gualtar - 4705-057 BRAGA

efectuado por computador, tendo-se utilizando o software LabVIEW®, que, actuava ligando/desligando bombas e válvulas de acordo com os tempos estabelecidos, em função dos sinais de entrada de tempo e/ou nível de líquido. A descrição detalhada do procedimento experimental encontra-se em Vieira (2006).

O SBBR operou com um efluente sintético contendo 300 mg·L<sup>-1</sup> de carência química de oxigénio (CQO) e 35 mg L<sup>-1</sup> de azoto (N), na forma de amónio, sendo a razão CQO/N semelhante à dos efluentes domésticos (8.6 g·g<sup>-1</sup>). A carga média em termos de matéria orgânica e azoto foi de 1.22 kg·m<sup>-3</sup>·d<sup>-1</sup> e 0.14 kg·m<sup>-3</sup>·d<sup>-1</sup>, respectivamente. O efluente sintético tem a seguinte composição: 643 mg·L<sup>-1</sup> de NaCH<sub>3</sub>COO·H<sub>2</sub>O, 130 mg·L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>Cl, 210 mg·L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub>, 44 mg·L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 1 mL·L<sup>-1</sup> de solução de microelementos (Vishniac e Santer, 1957).

Os iões amónio, nitrito e nitrato foram quantificados por espectrofotometria de acordo com o Standard Methods. O ião acetato foi quantificado por cromatografia líquida de alta pressão. A biomassa em suspensão e no biofilme foi quantificada por gravimetria acordo com o Standard Methods.

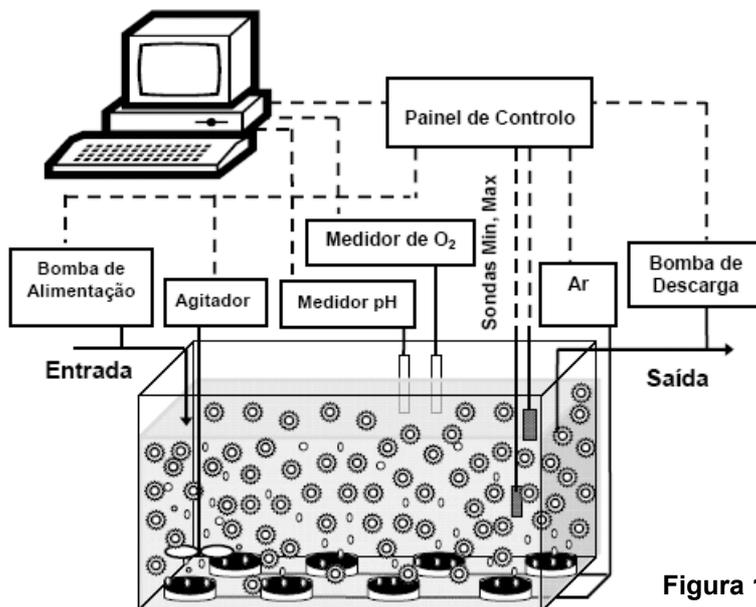


Figura 1 – Instalação experimental.

Alimentação	300 min									
Arejamento	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Descarga	20 min									

Figura 2 – Ciclo do SBBR com alimentação contínua, períodos intermitentes de arejamento e descarga

### Método de cálculo:

No início de cada ciclo a fase líquida contida no reator é caracterizada pelo volume estacionário  $V_E$  e pela concentração de cada componente  $i$ ,  $C_{E,to}^i$ , presente no instante inicial. Em cada ciclo, é fornecido um volume  $V_A$  de alimentação cuja concentração dos diversos componentes é definida por  $C_A^i$ . O reator atinge um volume máximo  $V_T$  que é igual à soma de volume estacionário  $V_E$  com o volume fornecido  $V_A$ . Finalmente é descarregado um volume  $V_D$ , com concentração  $C_D^i$ . No final do ciclo o reator atinge as condições com que inicia o ciclo seguinte com um volume  $V_E$  e concentração  $C_{E,tc}^i$ .

Um balanço de massa ao azoto no reator (componente  $N$ ), pode ser descrito pela seguinte equação:

N inicial + N fornecido + N formado = N final + N descarregado + N removido por reacção

$$C_{E,t_0}^N \cdot V_{E,t_0} + C_A^N \cdot V_A + m_{\text{formado}}^N = C_{E,t_c}^N \cdot V_{E,t_c} + C_D^N \cdot V_D + m_{\text{removido}}^N$$

Em estado estacionário, o reactor mantém as mesmas condições no início e no fim do ciclo, logo a equação anterior pode escrever-se da seguinte forma:

$$m_{\text{removido}}^N - m_{\text{formado}}^N = C_A^N \cdot V_A - C_D^N \cdot V_D$$

O azoto fornecido ao reactor SBBR sob a forma de amónio é gasto nos processos de nitrificação, desnitrificação e assimilação. O cálculo da contribuição de cada um destes processos para a remoção de azoto é feito relativamente ao azoto fornecido sob a forma de amónio.

Seguidamente apresentam-se em detalhe as equações utilizadas nos cálculos efectuados:

*Tempo de retenção hidráulico* (Wilderer et al., 2001)

$$TRH = t_c \cdot \frac{V_T}{V_E}$$

*Tempo de retenção celular* ou *idade das lamas* (Teichgräber et al., 2001)

$$TRC = \frac{m_{\text{reactor}}^{\text{SST-suspensão}} + m^{\text{ST-biofilme}}}{X_D^{\text{SST-suspensão}} \cdot \frac{V_D}{t_c}} \cdot \frac{t_R}{t_c}$$

*Carga orgânica* e *Carga de amónio* - representa a quantidade de carbono (definida em termos de CQO) e a quantidade de amónio (definida em termos de azoto) fornecidas ao reactor por unidade de volume e de tempo

$$L^{\text{CQO}} = \frac{C_A^{\text{CQO}} \cdot V_A}{V_E \cdot t_c} \quad L^{\text{N-NH}_4^+} = \frac{C_A^{\text{N-NH}_4^+} \cdot V_A}{V_E \cdot t_c}$$

*Capacidade de nitrificação* - representa a massa de amónio oxidado em cada ciclo, por unidade de volume do reactor. A massa de amónio oxidado calcula-se pela diferença entre a massa de amónio removido e a massa de amónio assimilado na biomassa durante um ciclo

$$N = \frac{m_{\text{oxidado}}^{\text{N-NH}_4^+}}{V_E} = \frac{m_{\text{removido}}^{\text{N-NH}_4^+} - m_{\text{assimilado}}^{\text{N-NH}_4^+}}{V_E} \quad m_{\text{assimilado}}^{\text{N-NH}_4^+} = m_{\text{removido}}^{\text{Ac}} \cdot \nu_{\text{NH}_4^+/\text{Ac}}$$

*Taxa de nitrificação* - corresponde à capacidade de nitrificação do reactor por unidade de tempo. O tempo considerado é o período em que existem condições aeróbias ( $t_{\text{AER}}$ ). O período de tempo aeróbio ( $t_{\text{AER}}$ ) não corresponde exactamente ao período de arejamento ( $t_{\text{AR}}$ ) porque no início dos períodos de mistura, existe ainda algum oxigénio. Nesses casos, o valor real da taxa de nitrificação situa-se entre um valor mínimo e um valor máximo, considerando que ocorre nitrificação durante todo o processo, ou apenas durante o período de arejamento, respectivamente.

$$q_N = \frac{N}{t_{\text{AER}}} \quad q_{\text{min}}^N = \frac{N}{t_R} \quad q_{\text{max}}^N = \frac{N}{\sum t_{\text{AR}}}$$

*Percentagem de nitrificação* - corresponde à razão entre a massa de amónio oxidado e a massa de amónio fornecido

$$\% \text{ Nitrificação} = \frac{m_{\text{removido}}^{\text{N-NH}_4^+} - m_{\text{assimilado}}^{\text{N-NH}_4^+}}{C_A^{\text{N-NH}_4^+} \cdot V_A} \cdot 100$$

**Capacidade de desnitrificação** – corresponde à massa de nitrato e nitrito ( $\text{NO}_x$ ) removidos durante um ciclo, por unidade de volume do reator

$$DN = \frac{\left( m_{\text{removido}}^{\text{N-NH}_4^+} - m_{\text{assimilado}}^{\text{N-NH}_4^+} \right) - C_D^{\text{N-NO}_x} \cdot V_D}{V_E}$$

**Taxa de desnitrificação** - corresponde à capacidade de desnitrificação do reator por unidade de tempo. O tempo considerado é o período em que existem condições anóxicas ( $t_{\text{AN}}$ )

$$q^{DN} = \frac{DN}{t_{\text{AN}}}$$

O período de tempo anóxico ( $t_{\text{AN}}$ ) não corresponde exactamente ao período de mistura ( $t_M$ ) porque durante os períodos de mistura, existe ainda algum oxigénio. Em algumas situações é difícil de saber o valor exacto de  $t_{\text{AN}}$ . Nesses casos, calculou-se um valor mínimo para a taxa de desnitrificação, considerando que ocorre desnitrificação durante todo o período de mistura.

$$q_{\text{min}}^{DN} = \frac{DN}{\sum t_M}$$

**Percentagem de desnitrificação** - razão entre a massa de  $\text{NO}_x$  removido e a massa de amónio fornecido

$$\% \text{ Desnitrificação} = \frac{m_{\text{removido}}^{\text{N-NO}_x}}{C_A^{\text{N-NH}_4^+} \cdot V_A} \cdot 100$$

**Percentagem de assimilação** - razão entre a massa de amónio assimilado e a massa de amónio fornecido

$$\% \text{ Assimilação} = \frac{m_{\text{assimilado}}^{\text{N-NH}_4^+}}{C_A^{\text{N-NH}_4^+} \cdot V_A} \cdot 100$$

**Percentagem de remoção de azoto** - razão entre a massa de azoto removido e a massa de azoto fornecido

$$\% \text{ Remoção N} = \frac{C_A^{\text{N-NH}_4^+} \cdot V_A - C_D^{\text{N}} \cdot V_D}{C_A^{\text{N-NH}_4^+} \cdot V_A} \cdot 100$$

### **Hibridação in situ de sondas oligonucleotídicas e microscopia confocal laser de varrimento**

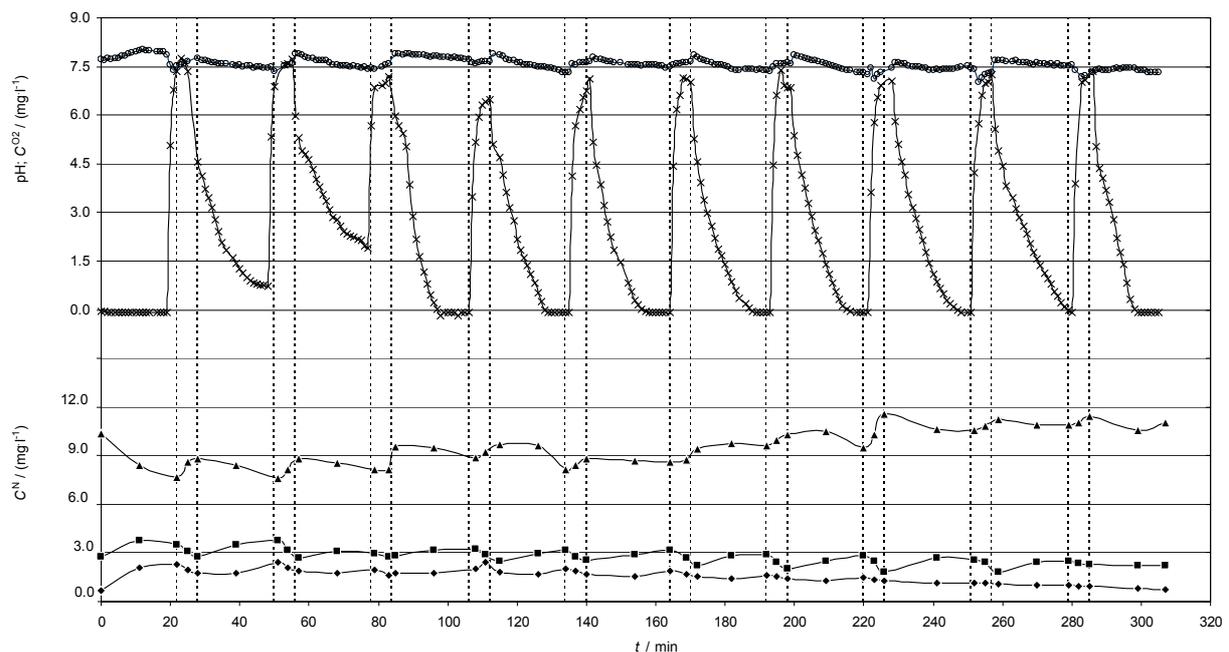
A composição microbiana do biofilme foi estudada utilizando-se a técnica da hibridação in situ de sondas oligonucleotídicas com o RNA ribossomal (*Fluorescence in situ hybridization*, FISH). O biofilme foi removido mecanicamente do suporte e homogeneizado. A suspensão microbiana obtida foi fixada numa solução de paraformaldeído ( $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), de acordo com o protocolo descrito por (Amann, 1995), e guardada a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . A caracterização das populações microbianas foi realizada utilizando-se sondas específicas para as bactérias oxidantes de amónio e de nitrito (Nogueira et al., 2002), segundo a técnica descrita em Manz et al. (1992). As sondas oligonucleotídicas foram sintetizadas e marcadas com os fluorocromos Cy3 e FLUOS (Interactica Biotechnologie GmbH, Ulm, Alemanha).

A detecção de fluorescência foi feita com o microscópio confocal laser de varrimento Zeiss LSM 510 (Zeiss, Jena, Alemanha) equipado com um laser de HeNe (543 nm) para a detecção de do fluorocromo Cy3 e um laser de Ar (450 nm – 514 nm) para a detecção do

fluorocromo Cy5. As imagens foram obtidas com a objectiva Plan-Apochromat da Zeiss, de imersão em óleo, com uma ampliação de 63 vezes.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil típico das concentrações dos iões amónio, nitrito, nitrato e acetato e do oxigénio em estado estacionário, nas condições estudadas, é apresentado na Figura 2. Não foi detectado acetato na fase líquida durante todo o ciclo, sendo que, nos períodos aeróbios, o acetato era consumido para crescimento e manutenção celular, enquanto que nos períodos anóxicos, o acetato também era consumido no processo de desnitrificação, facto que é visível pela redução da concentração de nitrato em cada intervalo não arejado. Durante os períodos não arejados o oxigénio foi consumido completamente.

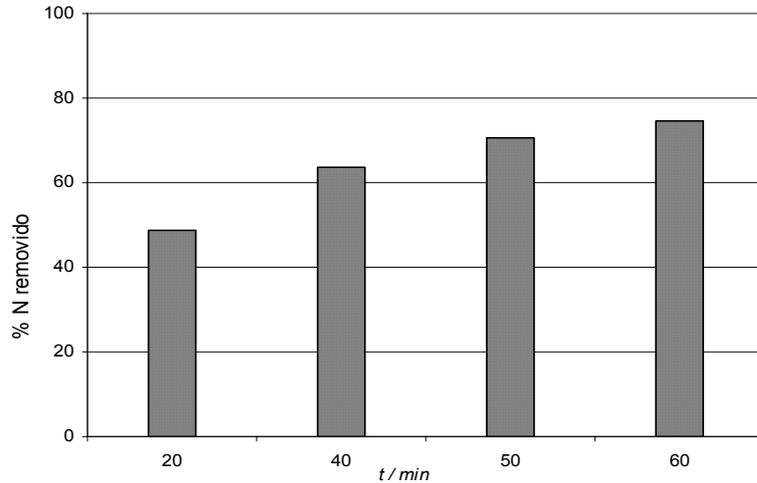


**Figura 3** – Perfis de concentração de oxigénio ( X ), pH ( o ), amónio ( ■ ), nitrito ( ◆ ) e nitrato ( ▲ ) no reator em regime de alimentação contínua, arejamento intermitente de elevada frequência (???)

### Efeito da duração dos períodos arejados e não arejados na remoção de azoto

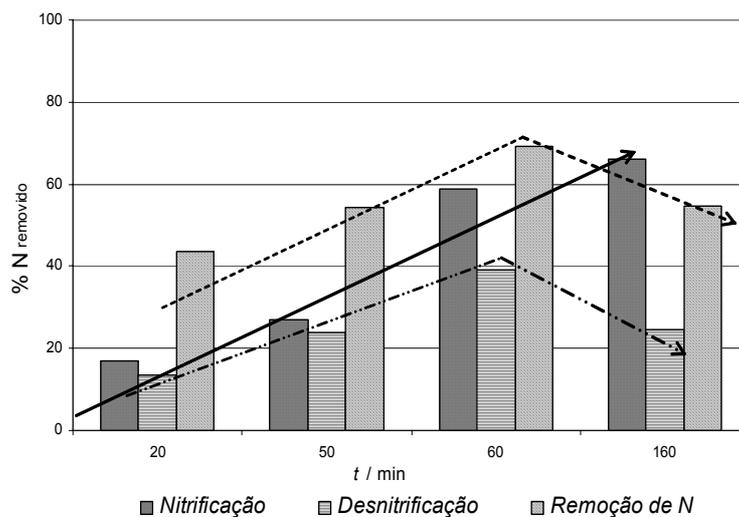
A duração dos períodos arejados e não arejados foi avaliada no SBBR a operar em duas condições distintas: na ausência e na presença de carbono orgânico, permitindo, deste modo, avaliar a competição entre microrganismos autotróficos e heterotróficos pelo oxigénio e a consequente extensão dos processos de nitrificação e desnitrificação.

Na ausência de carbono orgânico na alimentação e submetendo o SBBR a períodos crescentes de arejamento, compreendidos entre 20 min e 60 min por ciclo, observou-se o aumento da percentagem de azoto nitrificado (Figura 3), tal como seria de esperar. O aumento da disponibilidade de oxigénio e a ausência de competição pelas bactérias heterotróficas favoreceu o metabolismo das bactérias autotróficas e deste modo o processo da nitrificação.



**Figura 4** – Percentagem de nitrificação obtida na ausência de carbono orgânico na alimentação, com diferentes tempos totais de arejamento, em condições de arejamento de elevada frequência.

A remoção máxima de azoto no SBBR a operar na presença de carbono orgânico e com períodos crescentes de arejamento foi cerca de 70 % do azoto amoniacal fornecido, para um período total de arejamento de 60 min, valor correspondendo a 20 % do tempo total do ciclo (Figura 4). A percentagem de amónio oxidado a nitrato aumentou com o tempo de arejamento, enquanto que o azoto desnitrificado (nitrato ou nitrito reduzidos a azoto molecular) apresentou um valor máximo para um tempo total de arejamento de 60 min. Este resultado explica-se pelo facto do processo de desnitrificação depender do nitrato disponibilizado pelo processo de nitrificação e ser inibido pelo oxigénio dissolvido, cujo teor aumenta com o tempo de arejamento. Assim, dado que o nitrato e o oxigénio aumentam com a extensão do período de arejamento, justifica-se a existência de um período de arejamento que otimiza o processo de desnitrificação e, desta forma, a remoção total de azoto. O balanço mássico ao azoto no SBBR a operar nas condições óptimas indicou que cerca de 40 % do azoto fornecido na alimentação foi eliminado sob a forma de azoto molecular, 30 % foi incorporado na biomassa produzida e o restante foi descarregado na forma de nitrato.



**Figura 5** – Percentagem de nitrificação, desnitrificação e remoção de azoto em função do tempo de arejamento em condições de arejamento de elevada frequência

### Composição da comunidade microbiana nitrificante no biofilme

A composição da comunidade microbiana nitrificante no biofilme foi avaliada qualitativamente, utilizando-se a técnica FISH com sondas oligonucleotídicas de DNA (Figura 5). A hibridação in situ do biofilme com a sonda Nso1225 indicou que os microrganismos oxidantes de amônio pertenciam à sub-classe  $\beta$ -Proteobacteria. No biofilme, não foi detectado sinal de hibridação com a sonda Nit3, enquanto que com a sonda Ntspa662 se observou um sinal brilhante, excluindo-se, assim, a presença de bactérias do género Nitrobacter. Conclui-se, deste forma, que a oxidação de nitrito foi catalisada por Nitrospira, confirmando, o reconhecimento recente da importância desta bactéria na oxidação de nitrito em vários habitats (Daims et al., 2001).

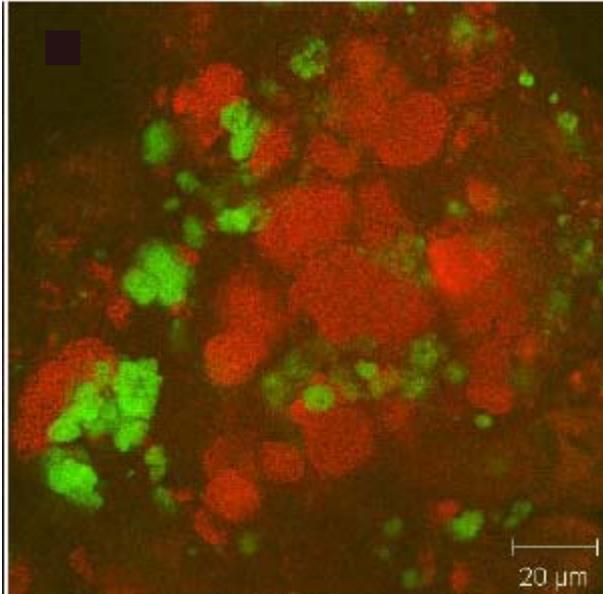


Figura 6 – Imagens de biofilme obtidas no microscópio confocal laser Zeiss LSM 510, após hibridação in situ com a sonda Ntspa662-Cy3 (vermelho) para a detecção de Nitrospira e com a sonda Nso1225-FLUOS (verde) para a detecção de todos os microrganismos oxidantes de amónio.

### CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou que o SBBR com arejamento intermitente de elevada frequência e alimentação contínua constitui uma tecnologia de elevado potencial para a remoção de azoto de águas residuais. Prevê-se que uma grande maioria dos sistemas de lamas activadas existentes, isto é, reactores contínuos, possam ser ampliados para realizar a remoção conjunta de carbono e azoto a custo reduzido adoptando um sistema de arejamento intermitente de elevada frequência, dado que o investimento num sistema de controlo de arejamento será rapidamente amortizado com a redução do consumo energético.

### BIBLIOGRAFIA

- Alves C., Nogueira R. and Brito A. "Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in a biofilm reactor". Biofilms 2004: Structure and Activity of Biofilms. Las Vegas (USA), 24–26 October, 2004.
- Artan N. and Orhon D. (2005). Mechanism and design of sequencing batch reactors for nutrient removal. IWA Scientific and Technical Report n° 19, IWA Publishing, London, UK.

Insel G., Sin G., Lee D. S., Nopens I. e Vanrolleghem P.A. 2006. A calibration methodology and model-based systems analysis for SBRs removing nutrients under limited aeration conditions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 81, 679-687.

Nogueira R., Melo L. F., Purkhold U., Wuertz S. and Wagner M. (2002) Microbial population dynamics versus nitrification performance in biofilm reactors: effects of hydraulic retention time and the presence of organic carbon. *Wat. Res.* 36 (2), 469–481.

Luostarinen S., Luste S., Valentin L., E Rintala J. (2006). Nitrogen removal from on-site treated anaerobic effluents using intermittently aerated moving bed biofilm reactors at low temperatures. *Water Research*, 40, 1607-1615.

Rodrigues A.C., Brito A.G. e Melo L.F. (2001). Post-treatment of a brewery wastewater using a Sequencing Batch Reactor. *Water Environment Research*, 73, 45-51.

Vieira M. (2005). Estudo da cinética de acumulação de polímeros de reserva num reactor de biofilmes para a remoção de azoto. Dissertação de Mestrado em Tecnologia do Ambiente. Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho.

Villaverde S., Garcia P. A., Lacalle M. L. e Fdz-Polanco F. 2000. New operational strategy for SBR technology for nitrogen removal from industrial wastewater highly loaded with nitrogen. *Water and Science Technology*. 3, 171-183.

Vishniac W. e Santer M. 1957. The Thiobacilli. *Bacteriological Reviews*, 21 (3), 195-213

Yoo H., Ahn K.H., Lee H.J., Lee K.G., Kwak Y.J. e Song K.G. 1999. Nitrogen removal from synthetic wastewater by simultaneous nitrification and denitrification (SND) via nitrite in an intermittently-aerated reactor. *Water Research*, 33, (1), 145-154.