

INFLUENCIA DE DIFERENTES MÉTODOS DE CRIOPRESERVAÇÃO NA RECUPERAÇÃO DA ATIVIDADE DO PROCESSO ANAMMOX

LUCAS ANTUNES SCUSSIATO^{1*}, AIRTON KUNZ², ALINE VIANCELLI³, ANDRÉ C. DO AMARAL⁴,
ANGÉLICA CHINI¹

¹ Mestrando em Engenharia Agrícola, UNIOESTE, (049) 8409-2119, lucas.a.scussiato@gmail.com

² Pesquisador da Embrapa Suínos e Aves; Professor do PGEAGRI/CCET - UNIOESTE

³ Doutora em Biotecnologia e Biociências;

⁴ Doutorando em Engenharia Agrícola, UNIOESTE;

Apresentado no
XLIII Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola - CONBEA 2014
27 a 31 de julho de 2014- Campo Grande- MS, Brasil

RESUMO: O processo ANAMMOX é considerado um avanço tecnológico, com grande potencialidade para remoção de nitrogênio em águas residuais de produção animal e agroindustrial. Porém, os microrganismos responsáveis pelo processo apresentam tempo de duplicação celular lento (6 dias), dificultando obtenção de biomassa necessária à partida de biorreatores em escala industrial. Assim, necessita-se de técnicas eficientes para criopreservação e posterior reativação desses microrganismos. O presente estudo objetivou testar duas soluções crioprotetoras: glicerol (25% v.v⁻¹) e leite desnatado em pó (12% v.v⁻¹). Para o teste, foram coletados 15 g de biomassa proveniente de um biorreator de bancada, com eficiência média de remoção de nitrogênio de 75% ±7. Após remoção do meio de cultura, adicionaram-se os respectivos crioprotetores, e a biomassa foi congelada à -80°C, onde permaneceu por 16 semanas. Em seguida, a biomassa foi descongelada e acondicionada em biorreatores de fluxo ascendente e contínuo, alimentado com meio de cultura sintético na concentração de 100 mgN.L⁻¹ e carga de alimentação de 8,1 kgN.m⁻³.d⁻¹. Aos 70 dias de operação, a biomassa criopreservada com leite desnatado em pó obteve melhor desempenho, recuperando 88% da eficiência de remoção de nitrogênio original, enquanto a biomassa criopreservada com glicerol obteve eficiência de apenas 42%.

PALAVRAS-CHAVE: Tratamento Biológico, Criopreservação, Anammox.

INFLUENCE OF DIFFERENT CRYOPRESERVATION METHODS ON THE REACTIVATION OF ANAMMOX PROCESS

ABSTRACT: The anammox process is considered an innovative technology to be applied in wastewater treatment, specially for nitrogen rich effluents (e.g. animal production and agroindustry). However, one of the anammox process limitations is the very low cell doubling time (6 days), that can reflect in a very long bioreactors start-up. Thus, biomass preservation and reactivation can reduce this problem requiring efficient methods to have the biomass available these microorganisms. The present study aimed to test two cryoprotectant solutions for anammox microorganisms preservation: glycerol (25% v.v⁻¹) and skim milk (12% v.v⁻¹). For the test, biomass was collected from a bioreactor with nitrogen removal efficiency of 75% (± 7). The biomass was washed the reactor culture medium and 15 g was added to the respective cryoprotectants and the biomass was frozen at -80°C, for 16 weeks. Then the biomass was inoculated in a continuous flow bioreactor fed with synthetic growth medium at a concentration of 100 mgN.L. After 70 operation days, the biomass previously cryopreserved with

skim milk showed better activity, recovering 88 % of the original removal efficiency, while biomass cryopreserved with glycerol presented only 42% of the original removal efficiency.

KEYWORDS: Biological Treatment, Cryopreservation, Anammox

INTRODUÇÃO: No Brasil, o modelo adotado para atender a grande demanda na produção e exportação de carne suína é o Sistema de Produção de Animais Confinados (SPACs). Esse modelo concentra um grande número de animais em pequenas áreas, objetivando redução de custos produtivos e melhoria nos controles sanitários (KUNZ *et al.*, 2009). Porém, a grande quantidade de efluentes gerados contém elevada concentração de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo. Dentre as espécies de nitrogênio, o N-NH₃ é um dos principais componentes em águas residuárias da produção animal e agroindustrial, necessitando ser removido quando não há possibilidade de valoração agrônômica (SCHEEREN *et al.*, 2011). Processos biológicos se apresentam como boa alternativa para remoção de nitrogênio. Na década de 90, pesquisadores descobriram o processo ANAMMOX (do inglês *Anaerobic Ammonium Oxidation*), considerado um avanço tecnológico com grande potencialidade para remoção de nitrogênio em águas residuais de produção animal e agroindustrial (STROUS *et al.*, 1998). Atuando em condições anóxicas, os microrganismos oxidam o íon amônio (NH₄⁺) diretamente a nitrogênio gasoso (N₂), utilizando nitrito (NO₂⁻) comoceptor final de elétrons (JETTEN *et al.*, 2009). Essas bactérias apresentam tempo de duplicação celular extremamente lento, dificultando obtenção de biomassa necessária para a partida de biorreatores em escala industrial. Assim, necessita-se de técnicas eficientes para conservação e posterior reativação desses microrganismos. Tentando preencher essa lacuna, alguns estudos têm buscado formas de preservar essas bactérias por meio de congelamento e ou criopreservação (ROTHROCK *et al.*, 2011 e HEYLEN *et al.*, 2012). Diante do exposto, o presente estudo objetivou a reativação de biomassa criopreservada com diferentes soluções protetoras: glicerol (25% v.v⁻¹) e leite desnatado em pó (12% v.v⁻¹).

MATERIAL E MÉTODOS: A biomassa utilizada foi coletada de um biorreator de bancada, alimentado com meio de cultura sintético na concentração de 200 mgN.L⁻¹, TRH de 3,3 horas e carga de alimentação de 1,2 kgN.m⁻³.d⁻¹ apresentando atividade estabelecida (75% ±7 na remoção de N). Para cada um dos biorreatores, foram coletadas 15 g biomassa (clone *Brasiliis concordiensis*) (VIANCELLI *et al.*, 2011), sendo lavada e peneirada para remover os nutrientes residuais antes de preservá-la. O tratamento controle não foi submetido a processos de preservação, sendo a biomassa utilizada coletada no dia da inoculação dos outros tratamentos. Um dos tratamentos utilizou a solução crioprotetora de glicerol (25% v.v⁻¹) e o outro tratamento utilizou leite desnatado em pó (12% v.v⁻¹) sendo ambos congelados à -80°C, onde permaneceram por 16 semanas (ROTHROCK *et al.*, 2011). Após esse período, a biomassa foi descongelada em um banho termostatizado (34°C), lavada com meio de cultura 100 mgN.L⁻¹, transferida para tubos de vidro com volume útil 0,9 L, com fluxo ascendente e contínuo, alimentado com meio de cultura sintético 100 mgN.L⁻¹ e carga aplicada de 8,1 kgN.m⁻³.d⁻¹. Os biorreatores foram inoculados com uma relação (30% v.v⁻¹) de biomassa, sendo fixados parâmetros como TRH em 0,33 horas e temperatura 34°C ±1. Para acompanhar o estabelecimento do processo ANAMMOX, foram realizadas semanalmente análises de nitrito (N-NO₂⁻), nitrato (N-NO₃⁻) e amônia (N-NH₃) (APHA, 2011), sendo os resultados obtidos comparados com a estequiometria do processo (STROUS *et al.*, 1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO: A Figura 1 ilustra o acompanhamento das cargas de nitrogênio aplicadas e removidas. Nos primeiros 50 dias (fase 1), apenas o tratamento controle apresentou atividade ANAMMOX, atingindo níveis de remoção de nitrogênio de 5,1 kgN.m⁻³.d⁻¹, mantendo-se estável até o término do período experimental. No período ente o 51º e 68º dias de operação (fase 2), inicia-se a remoção de nitrogênio nos tratamentos 1 e 2, essa diferença no tempo de partida dos reatores em comparação com o tratamento controle, pode estar relacionado ao fato de que o processo de criopreservação pode causar injúrias nas células das bactérias com atividade ANAMMOX. Outro fator que pode estar relacionado é o tempo de duplicação de bactérias ANAMMOX ser superior a 6

dias, o que favorece as bactérias nitrificantes, que têm taxa de duplicação de 7 horas (JETTEN *et al.*, 2009). Nesse período, o tratamento 2 obteve valores mais elevados de remoção de nitrogênio comparado ao tratamento 1.

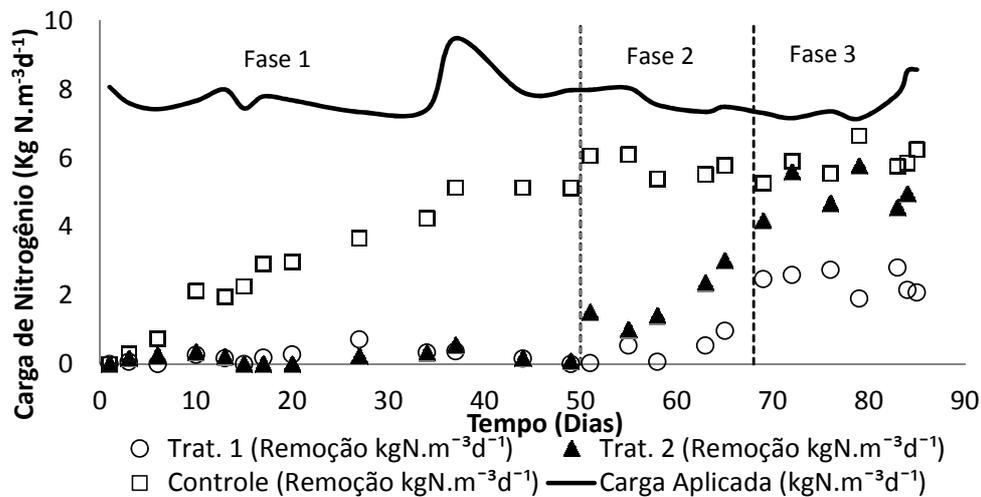


FIGURA 1. Acompanhamento das cargas de nitrogênio aplicadas e removidas. **Trat.1** (Tratamento com Glicerol), **Trat.2** (Tratamento com Leite Desnatado).

Após 70 dias de operação (fase 3) é estabelecido o processo ANAMMOX no tratamento 2 como pode ser observado na Figura 2 (Trat.2), onde os coeficientes estequiométricos obtidos permaneceram próximos da estequiometria proposta, obtendo valores de remoção de nitrogênio $5 \text{ kgN.m}^{-3}\text{.d}^{-1}$ (Figura 1), recuperando até 88% da eficiência de remoção de nitrogênio original. Após os 77 dias de operação o tratamento 1 ocorre estabelecimento da atividade ANAMMOX (Figura 2), obtendo valores de remoção de nitrogênio de $2,3 \text{ kgN.m}^{-3}\text{.d}^{-1}$ (Figura 1), com recuperação de apenas 42% da eficiência de remoção de nitrogênio original.

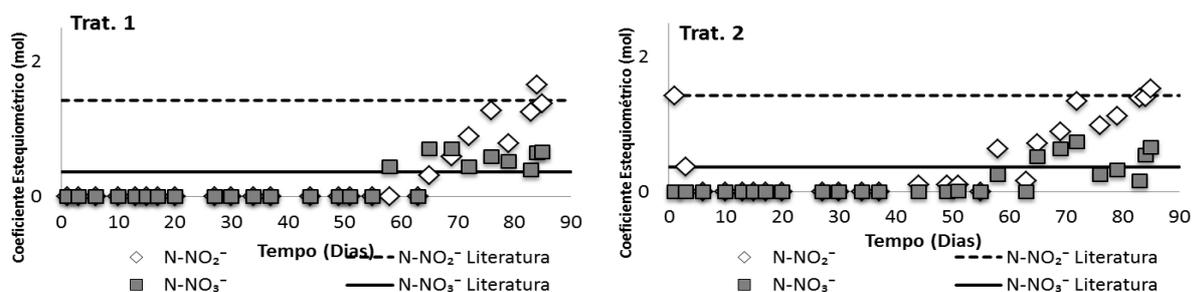


FIGURA 2. Acompanhamento dos coeficientes estequiométricos das formas NO_2^- e NO_3^- . **Trat.1** (Tratamento com Glicerol), **Trat.2** (Tratamento com Leite Desnatado). Linha tracejada: 1,43 mols, valor estequiométrico de NO_2^- para reação ANAMMOX (SCHIERHOLD NETO *et al.*, 2006). Linha Contínua: 0,37 mols, valor estequiométrico de NO_3^- para reação ANAMMOX (SCHIERHOLD NETO *et al.*, 2006).

CONCLUSÕES: As metodologias avaliadas mostraram-se adequadas para o reestabelecimento do processo anamnox. A biomassa criopreservada com a solução de leite desnatado em pó apresentou melhor desempenho na remoção de nitrogênio.

REFERÊNCIAS

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

Heylen, k; Ettwig, K.; Z.; Jetten, M.; Kartal, B..**Rapid and simple cryopreservation of anaerobic ammonium-oxidizing bactéria**. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY.p.3010-3013, 2012.

Jetten, M. S. M.; Niftrik, L. van; Strous,M.; Kartal, B.; Keltjens, J.T.; Camp, H. J. M. **Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria**. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology; 44(2–3): 65–84, 2009.

Kunz, A.; Miele, M.; Steinmetz, R. **Advanced swine manure treatment and utilization in Brazil**. Bioresource Technology, v. 100, p. 5485-5489, 2009.

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

Schierhold Neto, G. F.; Kunz, A.; Vanotti, M.B.; Soares, H.M.; Mattei, R.M.,**Aclimação e acompanhamento da atividade de lodos de efluentes de suinocultura para remoção de nitrogênio pelo processo de oxidação anaeróbia de amônia (ANAMMOX)**. Paper presented at 30th Congreso Interamericano de Ingenieria Sanitaria y Ambiental. Punta del Este, Uruguay, 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**. ApplMicrobiolBiotechnol, v50, p.589-596, 1998.

Viancelli, A.; Kunz, A.; Esteves, P.A.; Bauermann, F. V.;Furukawa, K.; Fujii, T.; Antônio, R. V.; Vanotti,M.. **Bacterial Biodiversity from an Anaerobic up Flow Bioreactor with ANAMMOX Activity Inoculated with Swine Sludge**. BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY. Vol.54, n. 5: pp.1035-1041. 2011.