

## EFEITO DA LIOFILIZAÇÃO NA REATIVAÇÃO DE BACTÉRIAS COM ATIVIDADE ANAMMOX

Lucas Antunes Scussiato<sup>1\*</sup>; Airton Kunz<sup>2</sup>; Marcelo Bortoli<sup>3</sup>; Aline Viancelli<sup>4</sup>;  
André C. do Amaral<sup>5</sup>; Angélica Chini<sup>6</sup> e Lidimara Suzin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Eng<sup>o</sup> Ambiental - Universidade do Contestado, Concórdia, bolsista da Embrapa Suínos e Aves

e-mail: lucas.a.scussiato@gmail.com

<sup>2</sup>Pesquisador da Embrapa Suínos e Aves

<sup>3</sup>Doutorando em Engenharia Química – UFSC

<sup>4</sup>Doutora em Biotecnologia e Biociências

<sup>5</sup>Doutorando em Engenharia Agrícola – UNIOESTE

<sup>6</sup>Mestranda em Engenharia Agrícola – UNIOESTE

**Palavras-chave:** ANAMMOX, liofilização, reativação.

### INTRODUÇÃO

Na década de 90 pesquisadores desenvolveram uma nova tecnologia para remoção de nitrogênio de dejetos de suíno (1). Esse processo foi chamado de ANAMMOX (do inglês *Anaerobic Ammonium Oxidation*), e é considerado um dos mais inovadores avanços tecnológicos (2). Atuando em condições anóxicas, microrganismos oxidam o íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) diretamente a nitrogênio gasoso ( $\text{N}_2$ ), utilizando nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) comoceptor final de elétrons (2). Até o momento, 12 espécies de bactérias foram identificadas como responsáveis pelo processo ANAMMOX (2). Essas bactérias, não são passíveis de serem isoladas em culturas puras, nem cultivadas por métodos bacteriológicos tradicionais por terem um tempo de duplicação extremamente lento de 11 a 20 dias (3), o que torna o *start up* dos sistemas de tratamento uma tarefa laboriosa e condicionada a manutenção de uma cultura constante no laboratório como fonte de inóculo. Tentando preencher essa lacuna, alguns estudos têm buscado formas de preservar bactérias com atividade ANAMMOX por meio de congelamento (4 e 5). Diante disso, o presente estudo teve por objetivo avaliar o tempo necessário para estabelecimento de processo ANAMMOX utilizando biomassa liofilizada.

### MATERIAIS E MÉTODOS

Bactérias com atividade ANAMMOX (20g), (clone *Brasiliis concordiensis*) (6) foram coletadas de um reator de bancada com atividade estabelecida (82%±4 de eficiência de remoção de N), colocadas em glicerol (25% v.v<sup>-1</sup>), pré-congeladas a -20°C e posteriormente liofilizadas e armazenadas por 4 meses em -20°C. Após esse período, a biomassa foi descongelada, lavada com meio de cultura sintético (100 mgN.L<sup>-1</sup>) para remoção de todo glicerol. A biomassa foi acondicionada em um tubo de ensaio de vidro, com fluxo ascendente e alimentado com meio de cultura sintético (100 mgN.L<sup>-1</sup>) operando em regime contínuo. Após o estabelecimento do processo ANAMMOX a carga de nitrogênio foi aumentada para (200 mgN.L<sup>-1</sup>). O biorreator foi inoculado com 20% (v.v<sup>-1</sup>) de biomassa, tempo de retenção hidráulica (TRH) de 0,55 horas e temperatura de 34°C ±1 (1). O reator foi acompanhado semanalmente através das análises de nitrito ( $\text{N-NO}_2^-$ ), nitrato ( $\text{N-NO}_3^-$ ), e amônia ( $\text{N-NH}_3$ ), para verificar o estabelecimento do processo ANAMMOX (7). Para confirmar a reativação do processo ANAMMOX, os resultados obtidos foram comparados com a estequiometria do processo (1).

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

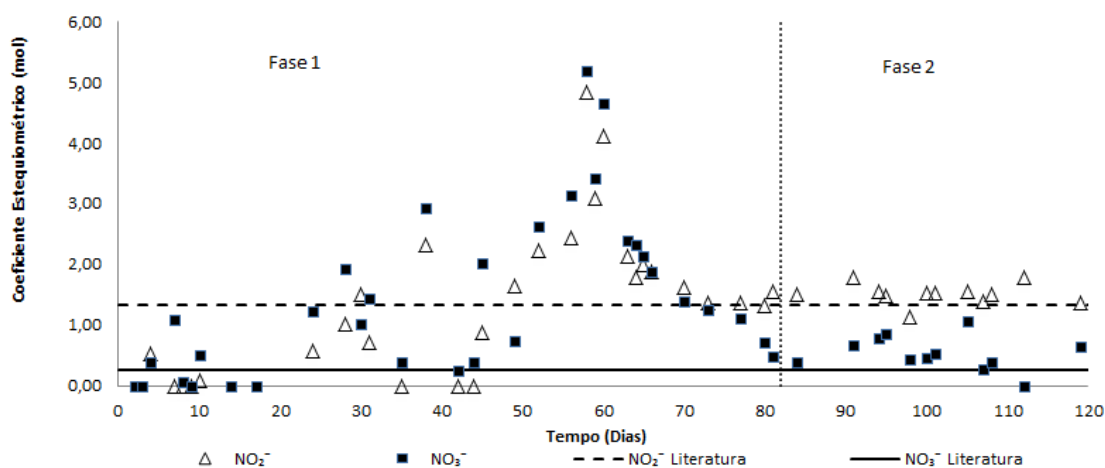
A (Figura 1) ilustra os coeficientes estequiométricos do estudo e os compara aos encontrados na literatura (2). Nos primeiros 48 dias (fase 1) o reator não apresentou atividade ANAMMOX. No período entre o 49º e 69º dias de operação, ocorreu processo de nitrificação. Isso pode estar relacionado ao fato de o tempo de duplicação de bactérias ANAMMOX ser de 11 dias, o que favorece as bactérias nitrificantes, que têm taxa de duplicação de 7 horas (3). O processo ANAMMOX se estabeleceu a partir de 82 dias de operação (fase 2). Recentemente, um estudo mostrou que utilizando biomassa ANAMMOX enriquecida e estabilizada, e as mesmas condições de operação descritas neste estudo, mas não utilizando método de preservação, o processo demorou 40 dias para se estabelecer (8). Na fase 2, o reator conseguiu recuperar 68% ±9 da eficiência original de remoção de nitrogênio, eficiência essa, que antes do processo de liofilização era de 82%±4. Quando o reator apresentou estabilidade do processo (83º aos 106º dias), realizou-se progressão de carga. Houve uma queda na eficiência média de remoção de nitrogênio, passando de 68%±9 para 64%±10. Contudo, o processo mantendo-se estável, permanecendo próximo da estequiometria proposta (Figura 1).

## CONCLUSÕES

Apesar do processo de liofilização ser amplamente empregado na manutenção de diferentes microorganismos, a sua aplicação resultou em uma partida mais lenta do sistema. Contudo, a reativação de bactérias com atividade ANAMMOX foi adequada, uma vez que o processo foi reestabelecido.

## REFERÊNCIAS

1. 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.
2. Kartal, B.; Almeida, N.M.; Maalcke, W. J.; Camp, H. J. M.; Jetten, M. S. M.; Keltjens, J. T. **How to make a living from anaerobic ammonium oxidation.** FEMS Microbiology Reviews. V 37, Issue 3, pages 428–461, 2013.
3. 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.
4. Rothrock MJ Jr, Vanotti MB, Szögi AA, Gonzalez MC, Fujii T. **Long-term preservation of anammox bacteria.** ApplMicrobiolBiotechnol. Oct;92(1):147-57. 2011.
5. Heylen, k; Ettiwig, K.; Z.; Jetten, M.; Kartal, B. **Rapid and simple cryopreservation of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria.** APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, p.3010-3013, 2012.
6. 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.
7. APHA, AWWA & WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater.** 19 ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2012.
8. C. G. Casagrande, A. Kunz, M. C. De Prá, C. R. Bressanand H. M. Soares. **High nitrogen removal rate using ANAMMOX process at short hydraulic retention time.** Water Sci Technol. 67(5):968-75. 2013.



**Figura 1.** Acompanhamento dos coeficientes estequiométricos das formas  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$ . Linha vermelha: 1,32 mols, valor estequiométrico de  $\text{NO}_2^-$  para reação ANAMMOX (Strouset al.,1998). Linha Azul: 0,26 mols, valor estequiométrico de  $\text{NO}_3^-$  para reação ANAMMOX (Strouset al.,1998).