

PESQUISA DE BACTÉRIAS ANAMMOX EM AMOSTRA DE LODO DE SISTEMA DE TRATAMENTO DE EFLUENTE DA SUINOCULTURA

Carolina Rucks¹, Jaqueline Klem Bohrer² Fabiane Goldschmidt Antes³, Sandra Camile Almeida Mota⁴, Airtton Kunz⁵

¹Graduanda de Agronomia pelo Instituto Federal Catarinense, Campus Concórdia, Estagiária da Embrapa Suínos e Aves, Bolsista CNPQ/PIBIC, carolrucks.cr@gmail.com

²Doutoranda de Engenharia Agrícola pela UNIOESTE, Estagiária da Embrapa Suínos e Aves

³Analista da Embrapa Suínos e Aves,

⁴Analista da Embrapa Suínos e Aves,

⁵Pesquisador da Embrapa Suínos e Aves

Palavras-chave: ANAMMOX, desamonificação, efluente suíno, bioaumentação

INTRODUÇÃO

A oxidação anaeróbica do amônio (ANAMMOX) é considerada um atalho dentre os processos de tratamento biológico de efluentes. Diferente do método mais comum, que usa nitrificação-desnitrificação, (1) na via ANAMMOX células bacterianas conseguem transformar amônio (NH_4^+) em nitrogênio gasoso (N_2) usando nitrito (NO_2^-) comoceptor de elétrons em meio anóxico (2). O nitrito que precisa ser adicionado ao meio para que a reação ANAMMOX ocorra pode ser produzido por outro gênero de bactéria, as *Nitrosomonas*, que transformam o amônio em nitrito usando oxigênio (processo de oxidação). Este consórcio de bactérias ANAMMOX com nitrificantes (desamonificação) já pode ser considerado um processo consolidado em escala de laboratório e com grande potencial para uso em escala real no tratamento efluentes (2).

Porém, um dos problemas enfrentados para a instalação do processo em escala real, onde é necessário ter um volume muito maior de lodo do que em escala de bancada, é o tempo de duplicação das bactérias ANAMMOX que é muito lento (10 – 12 dias aproximadamente) (3). Uma possível solução é a de inocular os reatores com lodo que possui as populações desejadas, porém inibidas ou em baixa quantidade, e através de determinadas condições oferecidas (temperatura, OD e pH por exemplo) favorecer o crescimento destas em detrimento das demais, técnica conhecida como bioaumentação.

Para selecionar um lodo com a presença de bactérias ANAMMOX para fazer a bioaumentação, técnicas de biologia molecular podem ser utilizadas para identificar a presença destas bactérias. Uma destas técnicas é a reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) que multiplica determinados fragmentos de DNA usando uma enzima (DNA-polimerase) para que assim possa ser obtido a concentração real de determinada bactéria na amostra. Neste trabalho foi utilizada a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) (4).

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de lodo e de água residuária da suinocultura foram coletadas de um Sistema de Tratamento de Efluentes da Suinocultura – SISTRATES[®], localizado na granja de suínos São Roque (Grupo Master Agroindustrial), em Videira/SC, Brasil. O lodo foi coletado de um reator nitrificante do sistema.

Foi feita a caracterização da água residuária e do lodo do reator nitrificante com análises físico-químicas e de DNA. Para as análises de N-NH_4^+ , N-NO_2^- , e N-NO_3^- foi utilizado o sistema de análise por injeção em fluxo (Fialab Instruments, Seattke, EUA, modelo 2500 para análise). Alcalinidade foi determinada por método titulométrico em titulador modelo 848 Titrino plus, Metrohm, Herisau, Suíça (5). Carbono orgânico total (COT) por analisador modelo TOC-LCPH/CPN, Shimadzu, Kyoto, Japão) com auto-amostrador Shimadzu, seguindo instruções do fabricante.

Nas análises de sólidos suspensos totais (SST), fixos (SSF) e voláteis (SSV) do lodo foi seguido o procedimento descrito no Standard Methods (5) As amostras foram filtradas usando um filtro de porosidade 0,45 μm e um cadinho de Gooch. Em seguida, as amostras foram secas em estufa a 105 °C por uma hora (SST) e calcinadas em mufla a 550 °C por uma hora (SSF). Os sólidos suspensos voláteis (SSV) foram calculados subtraindo-se os SSF dos SST.

Para análise de DNA as amostras de lodo foram centrifugadas para concentrar as células e o sobrenadante foi descartado. A fração sólida foi transferida para microcubos que foram armazenados a -20 °C até a extração do DNA. A extração do DNA foi conduzida a partir de 0,25 g de lodo, utilizando o Qiagen Dneasy PowerSoil Pro Kit e foi seguido o protocolo padrão do fabricante. As concentrações de DNA foram determinadas utilizando um espectrofotômetro NanoDrop2000 (Thermo Scientific, EUA). Para realização do qPCR, as amostras foram ajustadas a uma concentração de DNA de 20 ng μL^{-1} . Foram utilizados os primers específicos (16S RNA A438F: 5'-GTC RGG AGT TAD GAA ATG -3' e A684R: 5'-ACC AGA AGT TCC ACT CTC -3') de acordo com (6). A quantificação de ANAMMOX foi feita por qPCR no equipamento modelo 7500 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) e foi utilizado fragmento sistêmico g-block para obtenção da curva de calibração na faixa de 22,3 a 2,23x10⁶ cópias/ μL (IDT, EUA). As condições de amplificação usadas no programa consistem em 95 °C por 2 minutos no *holding stage* seguidos de 40 ciclos de desnaturação por 15 segundos (95 °C), anelamento e extensão dos iniciadores por 1 minuto a 60 °C. O programa se encerra com a elaboração da curva de melting (ou de dissociação), a

fim de avaliar a pureza dos produtos amplificados. Esta etapa consiste em 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C, 30 segundos a 95 °C e 15 segundos a 60 °C. A análise foi feita em duplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da caracterização do efluente final e do lodo nitrificante coletados no SISTRATES® estão apresentados na Tabela 1. Pode-se observar que o sistema de tratamento apresenta boa eficiência de tratamento, uma vez que a concentração de nitrogênio amoniacal ($N-NH_4^+$) está inferior a $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, com a presença de baixas concentrações de $N-NO_2^-$, $N-NO_3^-$ e COT. A concentração de $N-NH_4^+$ e de COT na alimentação do sistema na mesma data da coleta da amostra do reator era de $451,1 \pm 5,65 \text{ mg L}^{-1}$ e $1551,5 \text{ mg L}^{-1}$ respectivamente, o que corresponde a eficiências de remoção de 100% de N e de 92% de COT.

Na amostra do lodo do reator de nitrificação foi feita a determinação de SST, SSV e SST e de acordo com os resultados obtidos (Tabela 1), a relação SSV/SST estava em 0,68 o que está de acordo com os dados históricos do reator (1). Esta amostra foi submetida a extração de DNA para posterior análise por qPCR. A extração mostrou-se satisfatória de acordo com o resultado de quantificação de DNA ($366.5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$). A amplificação ocorreu no ciclo 15 da curva de q-PCR e a concentração de ANAMMOX foi de $2,05 \pm 0,1 \times 10^8$ cópias genômicas μL^{-1} (média \pm desvio padrão). Entre as repetições também foi feita a análise de branco (controle negativo) o qual não apresentou amplificação. Assim, os resultados da qPCR comprovaram a existência de bactérias ANAMMOX nesse lodo.

CONCLUSÕES

Através das análises realizadas foi possível comprovar a existência de bactérias ANAMMOX em lodo nitrificante de um reator que opera em escala plena, e que apresenta excelentes taxas de remoção de nitrogênio amoniacal. Assim, conclui-se que este lodo pode ser utilizado em pesquisas experimentais de bioaumentação, ou seja, favorecer o crescimento destas bactérias em detrimento das bactérias nitrificantes para posterior inoculação de reator ANAMMOX em escala real.

REFERÊNCIAS

1. Cândido D, Bolsan AC, Hollas CE, Venturin B, Tápparo DC, Bonassa G, et al. Integration of swine manure anaerobic digestion and digestate nutrients removal/recovery under a circular economy concept. *J Environ Manage.* 2022 Jan 1;301.
2. Chini A, Ester Hollas C, Chiapetti Bolsan A, Venturin B, Bonassa G, Egidio Cantão M, et al. Process performance and anammox community diversity in a deammonification reactor under progressive nitrogen loading rates for swine wastewater treatment. *Bioresour Technol.* 2020 Sep 1;311.
3. Ma B, Wang S, Cao S, Miao Y, Jia F, Du R, et al. Biological nitrogen removal from sewage via anammox: Recent advances. Vol. 200, *Bioresource Technology.* Elsevier Ltd; 2016. p. 981–90.
4. Pereira AD, Araújo JC de. Protocols for analysis and determinations in sewage samples Protocol 3 – Determination of bacteria and genes of the nitrogen cycle by qPCR. *Cadernos Técnicos Engenharia Sanitária e Ambiental.* 2022;2(4):21–6.
5. APHA. Standard methods for the examination of water and waste-water (12th ed.). American Public Health Association. 2012;56(4):684–684.
6. Humbert S, Zopfi J, Tarnawski SE. Abundance of anammox bacteria in different wetland soils. *Environ Microbiol Rep.* 2012 Oct;4(5):484–90.

Tabela 1. Caracterização de efluente final e do lodo nitrificante coletado

Parâmetro	Efluente final	Lodo nitrificante
Alcalinidade	504,4	-
$N-NH_4^+$ (mg L^{-1})	<0,5	-
$N-NO_2^-$ (mg L^{-1})	$3,61 \pm 0,40$	-
$N-NO_3^-$ (mg L^{-1})	$173,34 \pm 0,35$	-
COT (mg L^{-1})	125,08	-
SST (g L^{-1})	-	4,64
SSF (g L^{-1})	-	1,4
SSV (g L^{-1})	-	3,2