

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA E DA ATIVIDADE ESPECÍFICA E CONSUMO DE SUBSTRATO DE BACTÉRIAS ANAMMOX EM UM REATOR DE ESCALA LABORATORIAL

Alice Chiapetti Bolsan¹, Gabriela Bonassa³, Bruno Venturin³, Aline Viancelli⁴, Fabiane Goldschmidt Antes² e Airton Kunz^{2,3}

¹Graduanda em Ciências Biológicas pela Universidade do Oeste de Santa Catarina, Campus Joaçaba, bolsista CNPq/PIBIC na Embrapa Suínos e Aves, alice1bolsan@gmail.com

²Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

³Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR

⁴Universidade do Contestado, Concórdia, SC

Palavras-chave: nitrogênio, efluente, tratamento biológico.

INTRODUÇÃO

Pesquisas voltadas para remoção biológica de nitrogênio (N) buscam, além da remoção, a melhoria da eficiência, redução de custos e otimização de estratégias de operação e partida dos reatores. Dentre os processos mais modernos, destaca-se o processo biológico ANAMMOX (*Anaerobic Ammonium Oxidation*), o qual é um atalho no ciclo natural do nitrogênio, intermediado por bactérias quimiolitotróficas que convertem amônio (NH_4^+) e nitrito (NO_2^-) em gás nitrogênio (N_2) (1). Algumas estratégias podem ser aplicadas para aclimação e aumento da eficiência das bactérias envolvidas, para um rápido estabelecimento do processo. Além de testes cinéticos, que são ferramentas fundamentais para determinar a atividade das bactérias, esse tipo de microrganismos também possui algumas características fenotípicas, como a coloração, que proporciona informações relacionadas à atividade do lodo em questão (2). Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o aumento da abundância das bactérias e determinar a atividade específica e velocidade de consumo de substrato das mesmas durante a aclimação de lodo com atividade ANAMMOX em reator de escala laboratorial alimentado com efluente sintético. Esta é uma estratégia para a otimização da eficiência da comunidade microbiana envolvida para posterior aplicação no tratamento de efluentes reais.

MATERIAL E MÉTODOS

O processo ANAMMOX foi estabelecido em um reator EGSB, do inglês *Expanded Granular Sludge Bed*, de estágio único (volume útil = 1 L). O reator foi alimentado com meio de cultura sintético, em uma concentração de $200 \pm 17 \text{ mg N L}^{-1}$, sendo composto por nitrogênio na forma de NO_2^- (100 mg L^{-1}) e NH_4^+ (100 mg L^{-1}), nutrientes e micronutrientes (3). O experimento foi monitorado por 98 dias. Testes de cinética de consumo de substrato foram conduzidos no início e fim do período experimental, via determinação da atividade específica das bactérias, com base na velocidade de consumo de substrato (r_s , mg N-Nx h^{-1}) e velocidade específica de consumo de substrato (μ_s , $\text{mg N-NHx g}_{\text{SSV}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) (4), juntamente com determinação de sólidos suspensos totais (SST) voláteis (SSV) e fixos (SSF). Para a determinação da abundância da comunidade bacteriana com atividade ANAMMOX, amostra da biomassa foi submetida a extração do DNA por meio do kit comercial Power Soil (Mobio-Qiagen). Posteriormente, o material genético foi submetido a quantificação pela técnica de qPCR em equipamento modelo 7500 (Applied Biosystems), em reações contendo 50 μL de volume total, com iniciadores descritos por Ni *et al* (5), e condições padrão, utilizando método *SRBR green*. Os resultados foram expressos em cópias genômicas por mL.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantidade de inóculo a ser utilizado na partida do processo foi determinada em função de quão ativo o lodo em questão está. Considerando à taxa de duplicação que estas bactérias possuem (entre 9 e 11 dias), a utilização de lodos mais ativos é estratégica na operação de sistemas biológicos de remoção de N, diminuindo assim o tempo de partida/estabelecimento do processo (6). O período de aclimação da biomassa acompanhada no presente estudo foi favorável para o parâmetro r_s , visto que no início do experimento o consumo de NH_3 era de $68,16 \text{ mg N-NH}_3 \text{ h}^{-1}$ e no final obteve-se o valor de $84,15 \text{ mg N-NH}_3 \text{ h}^{-1}$, representando um aumento de 25%. O mesmo foi observado para o consumo de nitrito, onde o acréscimo foi de 19%, sendo que o valor inicial era de $85,05 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ h}^{-1}$ e no final de $99,75 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ h}^{-1}$. A concentração de biomassa inicial foi de $20,4 \text{ g}_{\text{SSV}} \text{ L}^{-1}$, o que resultou em μ_s de $3,28 \text{ mg N-NH}_3 \text{ g}_{\text{SSV}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e $4,09 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ g}_{\text{SSV}}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Após 98 dias de operação houve aumento na concentração de biomassa para $24,1 \text{ g}_{\text{SSV}} \text{ L}^{-1}$, resultando em um consumo de $3,49 \text{ mg N-NH}_3 \text{ g}_{\text{SSV}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e $4,14 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ g}_{\text{SSV}}^{-1} \text{ h}^{-1}$. O TRH e a concentração de N têm influência sobre a velocidade específica de consumo de nutrientes das bactérias, onde à medida que o TRH diminui, aumenta a carga de nitrogênio aplicada ao sistema (7), disponibilizando uma maior quantidade de substrato às bactérias e subsequente aumento do crescimento e quantidade de biomassa, fato observado pela concentração de SSV.

A quantificação molecular da comunidade com atividade ANAMMOX evidenciou que além do aumento da atividade e volume de biomassa observados no período avaliado, também houve o aumento da população de bactérias com atividade ANAMMOX em 99,99% (10^4 cópias genômicas mL^{-1}) (Figura 1), com as

estratégias de aclimação aplicadas (meio sintético $200 \pm 17 \text{mg N L}^{-1}$ e TRH de 1 hora). Isso corrobora com os dados de SSV, pois à medida que se obteve um aumento de biomassa, ocorreu também um aumento de expressão gênica (8). Grânulos com tonalidades mais avermelhadas são sinônimo de maior atividade de remoção de N (Figura 2), devido à elevada concentração de proteína *heme-c* resultante do metabolismo celular. Tais constituintes são oxidados quando ligados ao citocromo-c e provêm a coloração vermelha (2). Isso comprova que as condições aplicadas foram satisfatórias para favorecer a aclimação e enriquecimento de bactérias com atividade ANAMMOX.

CONCLUSÕES

As condições operacionais aqui apresentadas, foram satisfatórias para enriquecer a amostra de lodo ANAMMOX em relação à atividade específica de consumo de substrato e volume de biomassa. Além disso, a técnica de qPCR permitiu comprovar a expressão gênica de forma quantitativa. O processo tem grande potencial para a aplicabilidade para o enriquecimento de biomassa ANAMMOX previamente à partida de reatores em escala real para o tratamento de efluentes com altas cargas de N.

Agradecimento: PIBIC-CNPq

REFERÊNCIAS

1. A.MULDER; A.A.VAN DE GRAAF; L.A.ROBERTSON; J.G.KUENEN. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 16, n. 3, p. 177–183, 1995.
2. KARTAL, B; KELTJEAN, J.T. Anammox Biochemistry: a Tale of Heme c Proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 12, p. 998-1011, 2016
3. VANOTTI, M.B. Evaluation of environmentally superior technology: Swine waste treatment system for elimination of lagoons, reduced environmental impact, and improved water quality. USDA-ARS. 56 p. 2004.
4. DE PRA, M. C. **Estabelecimento e estudo cinético do processo de desamonificação utilizando-se um reator único para remoção de nitrogênio à temperatura ambiente**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia Química e de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2013.
5. NI, B; HU, B. Microbial and Physicochemical Characteristics of Compact Anaerobic Ammonium-Oxidizing Granules in an Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor. **Applied And Environmental Microbiology**, v.76, n. 8, p. 2652–2656.
6. STROUS, M.; KUENEN, J. G.; JETTEN, M. S. M. Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 3248–3250, 1999.
7. CHINI, A; KUNZ, A; VIANCELLI, A; SCUSSIATO, A, L; SANTOS, P, G. **Estudo cinético de consumo de nitrogênio pelo processo anammox**. XLIII Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola - CONBEA 2014.
8. VIANCELLI, A.; KUNZ, A.; ESTEVES, P. A.; BAUERMANN, F. V.; FURUKAWA, K.; FUJI, 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**, v. 54, n. 5, p. 1035–1041, 2011.

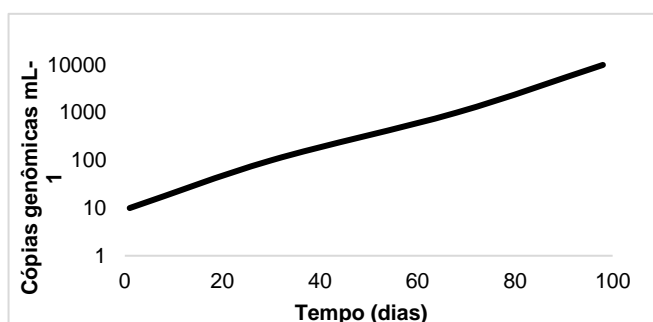


Figura 1. Quantificação de bactérias com atividade anammox ao longo de 98 dias do processo.



Figura 2. Variação da coloração da biomassa de reator com atividade ANAMMOX, no dia 1 e 98 do processo, respectivamente.