II-112 - EFEITO DO ANTIBIÓTICO NORFLOXACINA NA DIGESTÃO ANAERÓBIA DE DEJETO SUÍNO

Andressa Rezende Pereira[(1)]
Graduada em Engenharia Ambiental e Sanitária pela Universidade Federal de Juiz de Fora. Mestra e doutora em Engenharia Ambiental pela Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Pesquisadora na UFOP.
Aline Gomes de Oliveira Paranhos
Graduada em Química Industrial pela UFOP. Mestra em Engenharia Química pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR) e doutora em Engenharia Ambiental pela UFOP. Professora substituta do Departamento de Química da UFOP.
Sérgio Francisco de Aquino
Bacharel/Licenciado em Química pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). Mestre em Engenharia Hidráulica e Saneamento pela Universidade de São Paulo (USP). Doutor em Engenharia Química pelo Imperial College London. Professor Titular do Departamento de Química (DEQUI) da UFOP.
Silvana de Queiroz Silva
Graduação em Ciências Biológicas pela UFSCar. Mestra em Engenharia Hidráulica e Saneamento pela USP. Doutora em Microbiologia Ambiental pela University of Essex e Natural History Museum, Londres. Professora Associada do Departamento de Ciências Biológicas (DECBI) da UFOP.

Endereço[(1)]**:** Laboratório de Química Tecnológica e Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto – campus Morro do Cruzeiro, Ouro Preto - MG - CEP: 35400-000 - Brasil - Tel: (32) 984279982 - e-mail: andressa.rezende@engenharia.ufjf.br

RESUMO

A digestão anaeróbia apresenta-se como uma alternativa viável para o tratamento de dejetos de suinocultura, tanto do ponto de vista econômico quanto ambiental. Entretanto, a presença de certas substâncias nestes resíduos, tais como os antibióticos, pode prejudicar o desempenho deste processo, reduzindo a produção de biogás. Dessa forma, no presente trabalho, investigaram-se os efeitos do antibiótico norfloxacina na produção de metano a partir de dejetos suínos, bem como sua remoção durante a digestão anaeróbia, em ensaios de bancada. Os resultados revelaram que concentrações superiores a 500 μg L^{-1} de norfloxacina promoveram acúmulo de ácidos graxos voláteis nos reatores, mas apenas na maior concentração testada (150 mg L^{-1}) verificou-se inibição de 13% na produção de metano. Além disso, a modelagem cinética de decaimento do antibiótico confirmou que a adsorção foi o principal mecanismo de remoção, seguida pela biodegradação. Apesar do efeito inibitório causado pela maior dosagem testada, a digestão anaeróbia foi capaz de reduzir a concentração do antibiótico. Assim, confirma-se a digestão anaeróbia como um processo vantajoso e robusto, devido à geração de produtos com valor agregado, bem como à remoção de norfloxacina da fase líquida.

PALAVRAS-CHAVE: produção de metano; efeito inibitório; suinocultura.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o Brasil vem mantendo sua posição de destaque no mercado mundial de comercialização de proteína animal, ocupando a quarta posição para produção e exportação de carne suína (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, 2022a; United States Department of Agriculture – USDA, 2022). Para atender a elevada demanda do mercado, uma série de medidas de controle são adotadas nas granjas de confinamento de animais, destacando-se o uso de antibióticos. Tais substâncias podem ser utilizadas no tratamento e prevenção de doenças, enquanto o uso como promotores de crescimento é restrito. Dentre os compostos utilizados na criação de suínos, o antibiótico norfloxacina, pertencente à classe das fluorquinolonas, é amplamente empregado para tratar infecções do trato urinário, especialmente nas fases de creche e terminação nas granjas brasileiras (DUTRA et al., 2021).

Sabe-se que a maioria dos antibióticos são pouco absorvidos e metabolizados no organismo dos animais, sendo eliminados nas fezes e urina de forma praticamente inalterada (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006). Dessa forma, podem estar presentes no estrume, bem como em águas residuárias oriundas do confinamento.

Dentre as inúmeras técnicas de tratamento de dejetos, destaca-se a digestão anaeróbia (DA), que possibilita a estabilização de matéria orgânica, redução de odores e organismos potencialmente patogênicos, além da possibilidade de recuperação de produtos de valor agregado, como o biogás, rico em metano, e o digestato. Adicionalmente, durante a DA, pode ocorrer a degradação de antibióticos e outros microcontaminantes, caso estes estejam presentes nos dejetos (MITCHELL et al., 2013).
A presença destas substâncias pode causar efeitos ao consórcio microbiano envolvido na degradação anaeróbia do conteúdo orgânico, devido à sua ação bactericida/bacteriostática, e prejudicar o desempenho das unidades de tratamento. Na literatura, diversos estudos vêm reportando efeitos inibitórios dos antibióticos, tais como a norfloxacina, em dejetos suínos, com vistas à produção de biogás/metano (WEN; YANG; CHEN, 2021; ZHU et al., 2021). Em geral, conforme os dados da literatura, observa-se que a adição de norfloxacina em concentrações elevadas (50 e 130 mg L^{-1}) impacta drasticamente o equilíbrio da comunidade microbiana responsável pela conversão do conteúdo orgânico em metano, ocasionando em um acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs), como acetato, propianato, butirato. Entretanto, nestes mesmos estudos, a remoção do antibiótico via DA também foi mencionada, principalmente ligada aos mecanismos de adsorção ao lodo e biodegradação (WEN; YANG; CHEN, 2021; ZHU et al., 2021).

Considerando este cenário, o presente trabalho visa avaliar, em escala de bancada, o efeito da presença da norfloxacina em crescentes concentrações na produção de metano via digestão anaeróbia do dejeto suíno, bem como a remoção do antibiótico norfloxacina nestas condições.

OBJETIVOS

- Avaliar o efeito da norfloxacina, sob diferentes concentrações, na produção de metano, em ensaios de digestão anaeróbia em escala de bancada, utilizando o dejeto bruto de suinocultura;

- Avaliar a cinética de degradação da norfloxacina via digestão anaeróbia em escala de bancada, no dejeto bruto de suinocultura, bem como os possíveis mecanismos de remoção.

METODOLOGIA

O dejeto suíno utilizado nos ensaios de digestão anaeróbia foi coletado em uma granja de suinocultura de ciclo completo, do estado de Minas Gerais. Como substrato, foi utilizado o dejeto bruto, sem tratamento, advindo das baias de confinamento dos animais. Como inóculo, foi utilizado o lodo anaeróbio advindo do biodigestor da granja, que compõe o sistema de tratamento dos resíduos suínos.

Para a caracterização inicial do substrato/inóculo, bem como para demais determinações com relação aos experimentos de digestão anaeróbia, foram empregadas medições de pH (potenciômetro 827 da Metrohm), além das análises de Demanda Química de Oxigênio (refluxo aberto), Sólidos Totais (ST) e Sólidos Voláteis (SV), AGVs, alguns Cátions e Ânions, Metano e concentração de Norfloxacina (APHA/AWWA/WEF, 2005; LIMA et al., 2018; PEREIRA, 2022).

Dadas as condições definidas em testes preliminares, procedeu-se com os experimentos de digestão anaeróbia, adicionando-se doses variadas de norfloxacina, para se verificar os possíveis efeitos do antibiótico na produção de metano e na comunidade microbiana. Para isso, foram feitas soluções de trabalho do antibiótico (1 g L^{-1} e 10 g L^{-1}) em metanol, de modo a facilitar a solubilização do mesmo. Ressalta-se que o volume de metanol adicionado aos frascos foi contabilizado e contribuiu para a DQO incubada. Os experimentos foram montados em triplicata para cada dose, sendo que o volume de substrato e inóculo adicionado foi proporcional à relação A/M de 0,5 gSVs $gSVi^{-1}$ (KOCH et al., 2019), que é dependente do teor de sólidos voláteis das amostras.

Considerando os resultados obtidos por Wen, Yang e Chen (2021) e Zhu et al. (2021), que reportaram inibição da produção de metano nas concentrações de 50 e 130 mg L^{-1} de norfloxacina, respectivamente, foram definidas as seguintes doses do antibiótico: 0, 50, 100, 500 e 1.000 µg L^{-1} (faixa baixa); 10, 50 e 150 mg L^{-1} (faixa alta). A investigação das duas faixas de concentração visa verificar os possíveis efeitos de concentrações próximas à realidade, da ordem de µg L^{-1}, bem como concentrações mais elevadas, determinando assim a

capacidade limite ou de tolerância da comunidade microbiana caso elevadas concentrações cheguem à digestores anaeróbios em escala real.

Os experimentos foram mantidos a 35 ºC, representando a digestão mesofílica, com agitação de 180 rpm. A medição da produção de metano foi feita diariamente, até a estabilização da produção do gás, que se deu após 976 horas (aproximadamente 41 dias). Após abertura dos frascos, amostra da fase líquida foi tomada para determinação do perfil de AGVs e pH.

A fim de se avaliar o decaimento da concentração de norfloxacina durante a digestão anaeróbia de dejeto suíno, também foram realizados experimentos de cinética em dois níveis de dosagem: 100 µg L^{-1} e 10 mg L^{-1}, referentes às faixas baixa e alta. Nesses experimentos, foi adotada a estratégia de frascos de sacrifício, em duplicata, que foram abertos nos tempos de: 0, 1, 6, 12, 24, 72, 120, 216, 312 e 480 horas. Vale ressaltar que a concentração de norfloxacina advinda da mistura de dejeto e lodo proveniente da suinocultura foi contabilizada (93 µg L^{-1}).

O ajuste dos dados de decaimento da concentração de norfloxacina nestes experimentos foi testado com os modelos cinéticos de primeira ordem, primeira ordem com adsorção, segunda ordem e logístico. O modelo de primeira ordem ajustado para adsorção foi testado, perante a possibilidade de sorção da norfloxacina às partículas de lodo, como já reportado na literatura (WANG et al., 2006). Já o modelo logístico tem sido usado para descrever taxas de decaimento acompanhadas por um crescimento celular (NGUYEN; PINYAKONG; THAYANUKUL, 2019). Para a escolha do modelo que melhor descreveu o decaimento da concentração de norfloxacina durante a digestão anaeróbia, foi avaliado o coeficiente de determinação (R^2).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, foi feita a caracterização do dejeto suíno e lodo, com vistas ao conteúdo de sólidos totais e voláteis, matéria orgânica, AGVs (ácidos succínico, fórmico, acético e butírico), e alguns íons como amônio, nitrato, fosfato e sulfato, conforme Tabela 1.

Tabela 11: Caracterização do dejeto suíno e lodo, utilizados nos ensaios de digestão anaeróbia

	Dejeto suíno (substrato)	Lodo (inóculo)
ST* (g L^{-1})	7,5 ± 0,2	72,5 ± 0,6
SV* (g L^{-1})	4,4 ± 0,3	50,2 ± 0,6
DQO* (mg L^{-1})	5808 ± 1829	53460 ± 2800
AGVs (mg L^{-1})	1322[a]	280[b]
NH_4^+ (mg L^{-1})	858	1058
NO_3^- (mg L^{-1})	40	52
PO_4^{3-} (mg L^{-1})	167	22
SO_4^{2-} (mg L^{-1})	306	31

[a] ácido succínico (42%), fórmico (49%), acético (0,8%) e butírico (8,2%)
[b] ácido succínico (56%), fórmico (44%)
* triplicata

Nas Figuras 1a e 1b, é possível observar todos os perfis de produção acumulada de metano para cada um dos oito níveis de dosagem testados. Percebe-se um incremento da produção acumulada de metano, chegando a 314 $NmLCH_4$ $gDQO^{-1}$ para 500 µg L^{-1}, ou seja, nesta faixa foi observado efeito estimulante (Figura 1c), possivelmente influenciado pelo volume de metanol. É importante ressaltar que as massas de metanol adicionadas em todos os reatores (de 2,4 a 720 mg) ocasionaram concentrações deste solvente na faixa de 0,04 a 12 g L^{-1}. Segundo Blum e Speece (1991), concentrações de acima de 22 g L^{-1} podem causar inibição às arqueias metanogênicas, o que não foi constatado nos reatores. Portanto, o metanol pode ter sido incorporado como substrato e ser utilizado como fonte de carbono, por organismos metilotróficos, por exemplo.

No nível de norfloxacina seguinte (1.000 µg L^{-1}), houve um decréscimo em relação ao nível anterior, indicando que a partir desta concentração do antibiótico, haveria algum efeito inibitório sob a comunidade

microbiana envolvida na degradação anaeróbia do conteúdo orgânico. De fato, a partir desta concentração, observou-se um acúmulo de AGVs nos reatores (Figura 1d), especialmente os ácidos fórmico (100% para reatores contendo 1.000 µg L^{-1}) e acético.

Nas dosagens mais elevadas (10, 50 e 150 mg L^{-1} – Figura 1b), também foram observadas produções acumuladas de metano inferiores àquela observada na dose ótima (500 µg L^{-1}), sendo que na concentração de 150 mg L^{-1}, obteve-se a menor produção acumulada (208 $NmLCH_4$ $gDQO^{-1}$), inferior inclusive ao experimento controle (sem adição de norfloxacina). Nestes reatores também foi observado um acúmulo de AGVs após 976h (Figura 1d), porém observou-se um perfil diferente da curva de produção acumulada de metano, em relação aos experimentos de baixa concentração. Para as concentrações mais elevadas, observa-se uma tendência de estabilização da produção de metano, caracterizada pela formação de um patamar nas curvas. Porém, a produção volta a crescer para estes experimentos após esta fase de recuperação da comunidade microbiana às elevadas concentrações de antibiótico.

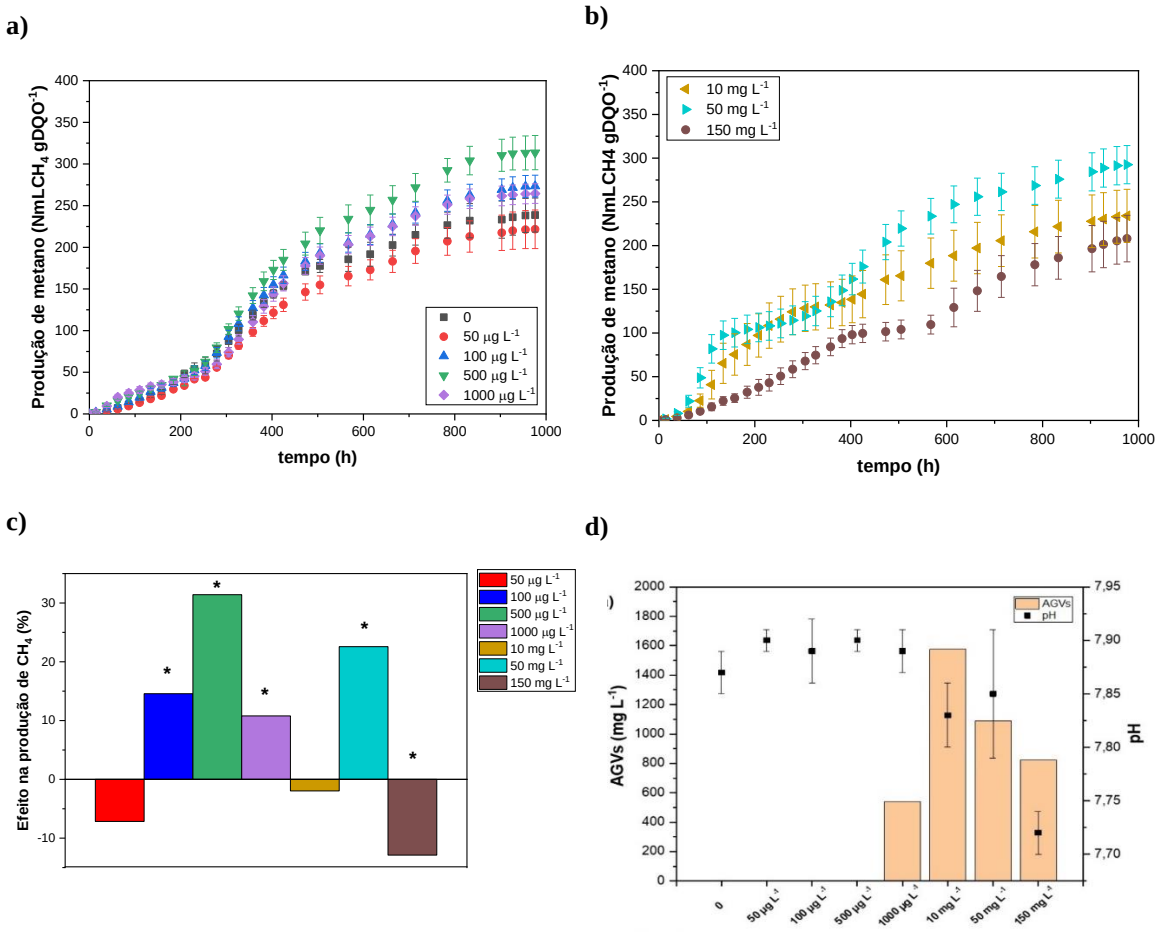

Figura 1: Produção acumulada de metano ao longo de 976h (~ 41 dias) de digestão anaeróbia nas doses de norfloxacina de 0, 50, 100, 500 e 1.000 µg L^{-1} - faixa baixa (a) e 10, 50 e 150 mg L^{-1} - faixa alta (b); efeito inibitório/estimulante na produção de metano ao final destes experimentos (barras com asterisco representam efeito significativo – *p-valor* ≤ 0,05) (c); perfil de AGVs e pH ao final dos experimentos (d)

Com relação aos experimentos de decaimento da concentração de norfloxacina (Figuras 2a e 2b), observou-se a redução da concentração do antibiótico após 20 dias de monitoramento, em ambos os experimentos. Vale ressaltar que a concentração de norfloxacina advinda da mistura de dejeto e lodo proveniente da suinocultura foi contabilizada no tempo 0h (93 µg L^{-1}).

O decaimento da concentração do antibiótico ao longo do tempo de ambos os ensaios foi testado para quatro modelos cinéticos. Alguns autores relatam que o modelo cinético de primeira ordem pode explicar o

decaimento de norfloxacina na digestão anaeróbia (CHEN et al., 2017; WEN; YANG; CHEN, 2021). No presente trabalho, o modelo de primeira ordem com adsorção, que leva em consideração da possibilidade de remoção do antibiótico por adsorção ao lodo (WANG et al., 2006), foi o que melhor explicou (R^2=0,9518) o decaimento da concentração de norfloxacina quando esta estava presente em baixa concentração (Figura 2a). Tal fato pode corroborar a hipótese de que o mecanismo predominante de remoção de norfloxacina na digestão anaeróbia foi a adsorção ao lodo/sólidos de origem da suinocultura, seguido ou não da internalização (passagem da superfície da célula para seu interior) do antibiótico.

Para os frascos em que uma concentração elevada de norfloxacina foi adicionada (Figura 2b), apesar do modelo de segunda ordem apresentar um melhor ajuste (R^2=0,9143), o modelo de primeira ordem com adsorção também representou bem o decaimento da concentração de norfloxacina (R^2=0,9046). Dessa forma, considerando o pH do meio (6,9 – 8,2) e as propriedades físico-químicas da molécula do antibiótico, especialmente o pKa, a substância estará na forma zwitteriônica, ou seja, eletricamente neutra, porém com uma carga positiva e outra negativa, facilitando a interação com as partículas que compõem o lodo, que tendem a ser negativamente carregadas. Acredita-se, neste caso, que há uma rápida adsorção do antibiótico à superfície das partículas suspensas quando este estava presente na concentração de 10 mg L^{-1}, devido ao maior gradiente de concentração entre as fases. Uma vez adsorvida à superfície da biomassa, a norfloxacina pode ser paulatinamente liberada para a fase líquida (devido ao equilíbrio de adsorção-dessorção) para ser metabolizada pelos microrganismos anaeróbios na fase líquida (biodegradação), a partir do transporte ativo. Dessa forma, a adsorção minimizaria eventualmente a forte inibição causada por concentrações elevadas do antibiótico, especialmente no início do experimento.

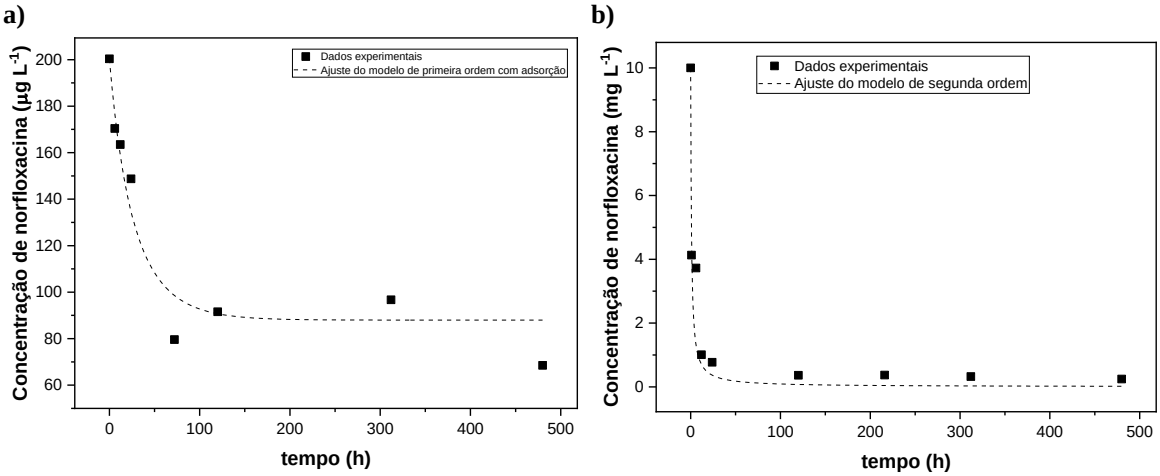

Figura 2: Variação da concentração de norfloxacina (medida e prevista pelo modelo cinético de melhor ajuste) ao longo dos experimentos de remoção de norfloxacina adicionada nas concentrações de 100 µg L^{-1} (a) e 10 mg L^{-1} (b)

CONCLUSÕES

Os resultados mostrados indicam que a presença de norfloxacina em concentrações mais baixas (até 500 µg L^{-1}) não impactou bruscamente a comunidade microbiana envolvida na degradação anaeróbia do dejeto suíno. Contudo, em concentrações elevadas, observa-se um acúmulo de AGVs nos reatores, com consequente impacto na produção acumulada de metano. De fato, na maior concentração testada (150 mg L^{-1}) observou-se inibição de 13% da produção de metano, em relação ao experimento controle. A adsorção parece ser o mecanismo predominante de redução da concentração de norfloxacina durante a digestão anaeróbia, enquanto a biodegradação tende ser um mecanismo secundário.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às seguintes agências/instituições pelo apoio financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Nacional de Saúde (FUNASA – nº 2510001557612017-21), Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq – nº

423101/2018-8), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APHA. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21. ed. Washington: American Public Health Association, Water Environmental Federation, 2005.
2. BLUM, D. J. W.; SPEECE, R. E. A database of chemical toxicity to environmental bacteria and its use in interspecies comparisons and correlations. *Research Journal of the Water Pollution Control Federation*, p. 198-207, 1991.
3. CHEN, J. et al. Removal of antibiotics from piggery wastewater by biological aerated filter system: treatment efficiency and biodegradation kinetics. *Bioresource Technology*, v. 238, p. 70-77, 2017.
4. DUTRA, M. C. et al. Antimicrobial Use in Brazilian Swine Herds: Assessment of Use and Reduction Examples. *Microorganisms*, v. 9, n. 4, p. 881, 2021.
5. EMBRAPAa. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: < https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/>. Acesso em 21 set. 2022.
6. KOCH, K. et al. Identification of critical problems in biochemical methane potential (BMP) tests from methane production curves. *Frontiers in Environmental Science*, p. 178, 2019.
7. LIMA, D. R. S. et al. Influence of different thermal pretreatments and inoculum selection on the biomethanation of sugarcane bagasse by solid-state anaerobic digestion: a kinetic analysis. *Industrial Crops and Products*, v. 111, p. 684-693, 2018.
8. MITCHELL, S. M. et al. The effects of the antibiotics ampicillin, florfenicol, sulfamethazine, and tylosin on biogas production and their degradation efficiency during anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, v. 149, p. 244–252, dez. 2013.
9. NGUYEN, X. T. K.; PINYAKONG, O.; THAYANUKUL, P. Bacterial community structures and biodegradation kinetic of Tiamulin antibiotic degrading enriched consortia from swine wastewater. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, v. 17, n. 2, p. 1121-1130, 2019.
10. PEREIRA, A. R. *Dinâmica de elementos de resistência a antibióticos no tratamento biológico de dejetos de suinocultura*. 2022. Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Escola de Minas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2022. 166 f.
11. SARMAH, A. K.; MEYER, M. T.; BOXALL, A. B. A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, v. 65, n. 5, p.725-759, out. 2006.
12. USDA. United States Department of Agriculture. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/advQuery>. Acesso em 22 jun. 2022.
13. WANG, Q.-Q. et al. Sulfadimethoxine degradation kinetics in manure as affected by initial concentration, moisture, and temperature. *Journal of Environmental Quality*, v. 35, n. 6, p. 2162-2169, 2006.
14. WEN, Q. et al. Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of swine manure with sulfamethoxazole and norfloxacin: Dynamics of microbial communities and evolution of resistance genes. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, v. 15, n. 5, p. 1-12, 2021.
15. ZHU, K. et al. Inhibition of norfloxacin on anaerobic digestion: Focusing on the recoverability and shifted microbial communities. *Science of the Total Environment*, v. 752, p. 141733, 2021.