



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

RAYANE KUNERT LANGBEHN

**EFEITO INIBITÓRIO DA TETRACICLINA E
OXITETRACICLINA EM BACTÉRIAS NITRITANTES E
NITRIFICANTES**

**FLORIANÓPOLIS
2018**

Rayane Kunert Langbehn

**EFEITO INIBITÓRIO DA TETRACICLINA E
OXITETRACICLINA EM BACTÉRIAS NITRITANTES E
NITRIFICANTES**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Engenharia
Química da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do Grau
de Mestre em Engenharia Química
Orientador: Prof. Dr. Hugo Moreira
Soares
Coorientadora: Prof^a Dr^a Camila
Michels

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Langbehn, Rayane Kunert
Efeito inibitório da tetraciclina e
oxitetraciclina em bactérias nitrificantes e
nitrificantes / Rayane Kunert Langbehn ;
orientador, Hugo Moreira Soares, coorientadora,
Camila Michels, 2018.
125 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós
Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. Engenharia Química. 3.
Inibição. 4. Antibióticos. 5. Nitrificação. I. Soares,
Hugo Moreira. II. Michels, Camila. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

**Efeito inibitório da tetraciclina e oxitetraciclina em culturas
nitritantes e nitrificantes**

Por

Rayane Kunert Langbehn

Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**, área de concentração de **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Dr. Hugo Moreira Soares
Orientador

Prof.^a Dr.^a Camila Michels
Coorientadora

Prof.^a Dr.^a Cíntia Soares
Coordenadora

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Paulo Belli Filho

Prof. Dr. Willibaldo Schmidell Netto

Florianópolis, 9 de março de 2018.

Dedico esta dissertação aos meus
amados pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por sempre me guiar e proteger.

Agradeço aos meus pais, Isaias e Anatilde, meus grandes exemplos, pelo amor, cuidado e confiança em todos os momentos da minha vida. Por compreenderem a distância física que faz parte dessa trajetória, mas que só tem sentido se for feita com vocês.

Ao Prof. Dr. Hugo pela orientação, apoio e por disponibilizar o laboratório para o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Camila pela coorientação, amizade e por sempre estar disposta a contribuir para o desenvolvimento deste trabalho.

Às minhas madrinhas, padrinhos, tios e primos pela torcida constante.

Aos amigos de Floripa pela parceria em trilhas, praias, gordices e baladinhas que alegraram os dias e mostraram a verdadeira magia dessa cidade. Também aos amigos de Minas e a tantos outros espalhados pelo Brasil por estarem presentes mesmo estando longe e tornarem a caminhada mais leve.

Aos amigos do LTBR pela ajuda em todos os momentos, por compartilharem conhecimentos, noites de pesquisa, cafés e muitas risadas.

À Central de Análises por disponibilizar os equipamentos, sempre que necessário.

Ao LCME pela realização das análises de MEV.

À UFSC por disponibilizar o espaço físico.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

RESUMO

A suinocultura é uma atividade de fundamental importância no contexto socioeconômico do estado de Santa Catarina. No entanto, os danos ambientais provocados por essa atividade são igualmente preocupantes pois geram efluentes com altas cargas de poluentes na forma de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo. Recentemente, a grande quantidade de antibióticos que são aplicados para garantir a sanidade e promover o crescimento dos animais também passou a ser alvo de preocupação na suinocultura, pois grande fração desses compostos sai do trato digestivo ainda na sua forma ativa e vão para as estações de tratamento de efluentes. Assim, os antibióticos podem interferir nos processos biológicos que ocorrem nesses sistemas, trazendo impactos com dimensões que ainda não são totalmente conhecidas. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de dois antibióticos utilizados na suinocultura (tetraciclina e oxitetraciclina) sobre culturas de bactérias responsáveis pela nitrificação. Para isso foram realizados testes cinéticos em batelada com diferentes concentrações de cada antibiótico sobre uma cultura enriquecida em bactérias nitrificantes (BOAs) e outra com bactérias nitrificantes (BOAs + BONs). Estes testes tiveram duração de 12 h nos quais foram quantificadas as concentrações de cada forma nitrogenada (amônia, nitrito e nitrato) e ao final foi avaliado o efeito sobre a morfologia através de imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados obtidos demonstraram que a tetraciclina possui maior efeito inibitório que a oxitetraciclina sobre as duas comunidades bacterianas. Também foi observado que a cultura nitrificante foi mais sensível à exposição aos antibióticos que a nitrificante, demonstrando que a maior complexidade da cultura bacteriana diminui os efeitos tóxicos dos antibióticos. Apesar de serem aplicadas concentrações de antibióticos elevadas, a concentração que inibe a atividade em 50% (CI-50) só foi alcançada para a cultura nitrificante exposta a tetraciclina, cujo valor foi de 257 mg·L⁻¹. As imagens de MEV mostraram que o aumento da concentração de antibiótico provocou danos profundos nas estruturas microbianas sendo proporcional à inibição obtida experimentalmente.

Palavras-chave: Inibição. Antibióticos. Tetraciclina. Nitrificação.

ABSTRACT

The swine industry has fundamental importance in the socioeconomic context of the Santa Catarina state. However, the environmental damages caused by this activity are unsettling because they generate effluents with high pollutant loads in the form of organic matter, nitrogen and phosphorus. Recently, the high amount of antibiotics applied to keep the herd healthy and to promote growth in animals also became a matter of concern in swine farms, since some of these compounds can leave the digestive system on its active form and reach the wastewater treatment. Thus, antibiotics can affect the biological processes occurring on those systems, bringing impacts with dimensions not yet fully known. Therefore, the goal of this study was to evaluate the effect of two antibiotics used in swine farms (tetracycline and oxytetracycline) on cultures of nitrifiers bacteria. For this, were performed kinetic tests with different concentrations of each antibiotic on an enriched ammonia oxidizing bacteria (AOB) culture and another with nitrifying bacteria (AOB + NOB). These tests had duration of 12 h in which the concentrations of each nitrogenous compounds (ammonia, nitrite and nitrate) were quantified and the effect on the morphology was evaluated through scanning electron microscopy (SEM) images. The results pointed out higher inhibitory effect for tetracycline on both bacterial communities. Also demonstrated that AOB culture was more sensitive to antibiotic exposure than nitrifying, therefore the greater complexity of bacterial culture reduces the toxic effects of antibiotics. Although high antibiotic concentrations were applied, the 50% activity inhibitory concentration (CI-50) was achieved only for AOB culture exposed to tetracycline, whose value was 257 mg·L⁻¹. SEM images exhibited strong damages on the microbial structures as the antibiotic concentration increased, which was proportional to the inhibition obtained experimentally.

Keywords: Inhibition. Antibiotics. Tetracyclines. Nitrification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais estruturas e processos bioquímicos afetados pela ação de alguns antibióticos. PABA: ácido paraaminobenzóico; DHF: dihidrofolato; THF: tetrahydrofolato.	37
Figura 2 – Possíveis fontes e caminhos para a ocorrência de antibióticos no meio-ambiente.	43
Figura 3 – Estrutura geral das moléculas de tetraciclina.	44
Figura 4 – Esquema ilustrativo do mecanismo de ação das tetraciclina.	45
Figura 5 – Esquema representativo do ciclo bioquímico do nitrogênio. Setas amarelas indicam reações de oxidação, vermelhas indicam reações de redução e as brancas não há modificação do número de oxidação... 52	52
Figura 6 – Esquema das etapas experimentais executadas neste trabalho.	59
Figura 7 – Esquema representativo do reator para obtenção de biomassa nitritante. 1: Recipiente de alimentação; 2: Bomba de alimentação; 3: Aerador; 4: Agitador mecânico; 5: Reator biológico com sistema de aquecimento; 6: Bomba de descarte; 7: Recipiente de descarte; 8: CLP.	60
Figura 8 – Esquema da configuração dos ciclos operacionais do reator NP.....	63
Figura 9 – Esquema da configuração dos ciclos operacionais do reator NT.	66
Figura 10 – Concentração das formas nitrogenadas e pH durante o período de operação do reator NP. As setas vermelhas indicam os dias de retirada de células para realização dos ensaios cinéticos.....	74
Figura 11 – Concentração das formas nitrogenadas durante o período de operação do reator NT. As setas vermelhas indicam os dias de retirada de células para realização dos ensaios cinéticos.	76
Figura 12 – Concentração de nitrogênio na forma de amônio ($N-NH_4^+$) em função do tempo para distintas concentrações de tetraciclina em bactérias (a) nitritantes e (b) nitrificantes.....	77

Figura 13 – Concentração ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) das formas nitrogenadas em função do tempo (h) nos ensaios cinéticos de exposição das bactérias nitrificantes à tetraciclina ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$): (a) 0; (b) 3; (c) 30; (d) 100; (e) 200; (f) 300; (g) 400 e (h) 500.	78
Figura 14 – Concentração ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) das formas nitrogenadas em função do tempo (h) nos ensaios cinéticos de exposição das bactérias nitrificantes à tetraciclina ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$): (a) 0; (b) 100; (c) 250; (d) 500; (e) 750 e (f) 1.000.	80
Figura 15 – Correlação entre o grau de inibição da atividade bacteriana e o logaritmo da concentração de tetraciclina em comunidades (a) nitrificantes e (b) nitrificantes.	82
Figura 16 – Modificação da cor do meio contendo tetraciclina ao longo do tempo nos ensaios com biomassa nitrificante (a) 0 h e (b) 12 h e nitrificante (c) 0 h e (d) 12 h.	84
Figura 17 – Varredura das amostras (a) soluções de tetraciclina $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$: 1 – em água; 2 – em meio sem NaHCO_3 ; 3 – em meio com $1,20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaHCO_3 ; 4 – em meio com o pH corrigido com KOH; 5 – em meio com $2,39\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaHCO_3 ; e (b) ao final do ensaio cinético com biomassa nitrificante e $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de tetraciclina.	85
Figura 18 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de biomassa (a) nitrificante e (b) nitrificante.	87
Figura 19 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de biomassa nitrificante expostas a (a) $30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, (b) $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e (c) $400\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de tetraciclina e das amostras de biomassa nitrificante expostas a (d) $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, (e) $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e (f) $1.000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de tetraciclina.	88
Figura 20 - Concentração de nitrogênio na forma de amônio (N-NH_4^+) em função do tempo para distintas concentrações de oxitetraciclina em bactérias (a) nitrificantes e (b) nitrificantes.	90
Figura 21 – Concentração ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) das formas nitrogenadas em função do tempo (h) nos ensaios cinéticos de exposição das bactérias nitrificantes à oxitetraciclina ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$): (a) 0; (b) 10; (c) 50; (d) 300; (e) 600; (f) 1.200 e (g) 1.400.	91
Figura 22 – Concentração ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) das formas nitrogenadas em função do tempo (h) nos ensaios cinéticos de exposição das bactérias nitrificantes	

à oxitetraciclina ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$): (a) 0; (b) 100; (c) 500; (d) 1.000; (e) 1.500 e (f) 2.000..... 92

Figura 23 – Correlação entre o grau de inibição da atividade bacteriana e o logaritmo da concentração de oxitetraciclina em comunidades (a) nitritantes e (b) nitrificantes. 94

Figura 24 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de biomassa nitritante expostas a (a) $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, (b) $600\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e (c) $1.400\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de oxitetraciclina e das amostras de biomassa nitrificante expostas a (d) $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, (e) $1.000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e (f) $2.000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de oxitetraciclina..... 96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química observada em dejetos suínos.....	34
Tabela 2 – Substâncias proibidas para uso como promotores de crescimento de acordo com a legislação brasileira vigente.....	40
Tabela 3 – Principais produtos de degradação da tetraciclina (TC), oxitetraciclina (OTC) e clortetraciclina (CTC).	47
Tabela 4 – Ocorrência de tetraciclinas em diferentes tipos de efluente.	50
Tabela 5 – Composição do meio de cultura inicial	61
Tabela 6 – Composição da solução de micronutrientes inicial	62
Tabela 7 – Composição do meio de cultura	62
Tabela 8 – Composição da solução de micronutrientes	62
Tabela 9 – Condições operacionais do reator NP.....	64
Tabela 10 – Condições operacionais do reator NT	66
Tabela 11 – Concentração de antibiótico utilizada nos ensaios com biomassa nitrificante.....	68
Tabela 12 – Concentração de antibiótico utilizada nos ensaios com biomassa nitrificante.	68
Tabela 13 – Composição das soluções. TC: tetraciclina.	70
Tabela 14 – Velocidades máximas de consumo de amônia e percentuais de inibição de diferentes concentrações de tetraciclina sobre bactérias nitrificantes.....	81
Tabela 15 – Velocidades máximas de consumo de amônia e percentuais de inibição de diferentes concentrações de tetraciclina sobre bactérias nitrificantes.....	81
Tabela 16 – Velocidades máximas de consumo de amônia e percentuais de inibição de diferentes concentrações de oxitetraciclina sobre bactérias nitrificantes.....	93
Tabela 17 – Velocidades máximas de consumo de amônia e percentuais de inibição de diferentes concentrações de oxitetraciclina sobre bactérias nitrificantes.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Δt - Intervalo de tempo $t - t_0$ (h)

$[N_NH_4^+]_{t_0}$ - Concentração de amônia no tempo $t=t_0$ ($mg \cdot L^{-1}$)

$[N_NH_4^+]_t$ - Concentração de amônia no tempo $t=t$ ($mg \cdot L^{-1}$)

ANAMMOX – *Anaerobic Ammonium Oxidation*

AOB – *Ammonia oxidizing bacteria*

BOA – Bactéria oxidadora de amônia

BON – Bactéria oxidadoras de nitrito

CASAN – Companhia de Saneamento de Água e Esgoto de Santa Catarina

CI-25 – Concentração que inibe 25% da atividade bacteriana

CI-50 – Concentração que inibe 50% da atividade bacteriana

CLP – Controlador lógico programável

DQO – Demanda química de oxigênio

DRNA – Redução dissimilativa do nitrato para amônia

HMDS - Hexametildisilazano

HPLC – *High performance liquid chromatography*

I – Inibição (%)

K – Potássio

LCME – Laboratório Central de Microscopia Eletrônica

LTBR – Laboratório de Tratamento Biológico de Resíduos

MEV – Microscópio eletrônico de varredura

$N-NH_4^+$ – Nitrogênio na forma de íon amônio

$N-NO_2^-$ – Nitrogênio na forma de nitrito

$N-NO_3^-$ – Nitrogênio na forma de nitrato

NOB – *Nitrite oxidizing bacteria*

NP – Nitrificação parcial

NT – Nitrificação total

N_{Total} – Nitrogênio total

OD – Oxigênio dissolvido ($mg O_2 \cdot L^{-1}$)

OTC – Oxitetraciclina

P_{Total} – Fósforo total

$r_{N_NH_4^+,0}$ - Velocidade máxima de consumo de amônia do ensaio de controle ($mg \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)

$r_{N_NH_4^+,i}$ - Velocidade máxima de consumo de amônia do ensaio contendo o antibiótico ($mg \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)

RBS – Reator de batelada sequencial

SHARON - *Single Reactor High Activity Ammonia Removal Over Nitrite*

SEM – *Scanning electron microscopy*

SSF – Sólidos suspensos fixos

SST – Sólidos suspensos totais

SSV – Sólidos suspensos voláteis

TC – Tetraciclina

THR – Tempo de retenção hidráulica (d)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
2 OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVO GERAL	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	33
3.1 SUÍNOCULTURA E O MEIO AMBIENTE.....	33
3.2 ANTIBIÓTICOS	35
3.2.1 Uso de antibióticos na suinocultura.....	38
3.2.2 Ocorrência de antibióticos em sistemas de tratamento de efluente e suas consequências.....	41
3.3 TETRACICLINAS.....	43
3.3.1 Uso e ocorrência em águas residuais.....	49
3.4 CICLO BIOQUÍMICO DO NITROGÊNIO	51
3.4.1 Nitrificação no tratamento de efluentes.....	54
3.4.2 Nitrificação parcial no tratamento de efluentes.....	56
4 METODOLOGIA	59
4.1 REATORES BIOLÓGICOS	59
4.1.1 Reator de nitrificação parcial (NP).....	60
4.1.1.1 Inóculo.....	61
4.1.1.2 Meio de Cultura.....	61
4.1.1.3 Partida e operação do reator	62
4.1.1.4 Monitoramento do reator NP.....	64
4.1.2 Reator de nitrificação total (NT)	64
4.1.2.1 Inóculo.....	65
4.1.2.2 Meio de cultura.....	65
4.1.2.3 Partida e operação do reator	65
4.1.2.4 Monitoramento do reator.....	66

4.2 ENSAIOS DE INIBIÇÃO EM BATELADA SOBRE AS CULTURAS BACTERIANAS.....	67
4.2.1 Cálculo da inibição.....	68
4.2.2 Microscopia eletrônica de varredura.....	69
4.2.3 Interferência da composição do meio sobre a tetraciclina	70
4.3 DETERMINAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS.....	71
4.3.1 Determinação de nitrogênio amoniacal.....	71
4.3.2 Determinação de nitrito.....	71
4.3.3 Determinação de nitrato.....	72
4.3.4 Determinação dos sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos voláteis (SSV) e sólidos suspensos fixos (SSF).....	72
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
5.1 ESTABELECIMENTO E MONITORAMENTO DOS REATORES PARA CRESCIMENTO DE BIOMASSA.....	73
5.1.1 Reator de nitrificação parcial (NP)	73
5.1.2 Reator de nitrificação total (NT).....	75
5.2 EFEITO DOS ANTIBIÓTICOS SOBRE A ATIVIDADE DAS CULTURAS BACTERIANAS.....	76
5.2.1 Efeito da tetraciclina sobre as culturas bacterianas.....	76
5.2.1.1 Interferência da composição do meio sobre a tetraciclina	83
5.2.1.2 Efeito da tetraciclina na morfologia das culturas bacterianas	86
5.2.2 Efeito da oxitetraciclina sobre as comunidades bacterianas	89
5.2.2.1 Efeito da oxitetraciclina na morfologia das culturas bacterianas	95
5.2.3 Comparação entre os efeitos provocados pelos antibióticos sobre as comunidades bacterianas.....	96
6 CONCLUSÕES.....	99
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	101
REFERÊNCIAS.....	103

APÊNDICE A	115
APÊNDICE B	119
APÊNDICE C	121
APÊNDICE D	124

1 INTRODUÇÃO

O consumo de carne no mundo tem sido intensificado nos últimos anos em função do aumento populacional e da mudança de hábitos alimentares. Assim espera-se que em 2050 o mesmo esteja próximo a 50 kg/pessoa/ano, o que representa um aumento de 28% comparado ao ano de 2007 (ALEXANDRATOS; BRUISMA, 2012). Para acompanhar este crescimento faz-se necessária a aplicação de métodos de produção intensiva que garantam o aumento da produtividade com redução da área de criação dos animais. No entanto, estes sistemas representam um grande risco ambiental por aumentarem e concentrarem a geração de efluentes com elevadas cargas de poluentes, fazendo urgente a aplicação de sistemas adequados para o tratamento e remoção destes compostos.

A aplicação da produção intensiva na suinocultura é uma prática que vem sendo aplicada no Brasil. No ano de 2016 o Brasil era o 4^a maior produtor mundial de suínos, com uma produção de 3,73 milhões de toneladas, dos quais 26% correspondem à produção do estado de Santa Catarina, maior produtor nacional. Do total produzido no estado (969 mil toneladas), 29% é destinado à exportação, sendo também o principal exportador de carne suína no Brasil (ABPA, 2017). Consequentemente, a suinocultura é uma atividade de grande importância para a economia catarinense, cujos bens e serviços produzidos pelo setor totalizaram R\$ 3,97 bilhões no ano de 2016, o segundo maior dentre as atividades agropecuárias desenvolvidas no estado (GIELH, 2017).

Apesar da importância econômica, a suinocultura é uma atividade de grande impacto ambiental. O efluente gerado caracteriza-se por ser concentrado em matéria orgânica e nutrientes, como nitrogênio e fósforo, e, além disso, é recorrente a ocorrência de antibióticos e outros fármacos que não foram metabolizados pelo organismo animal. O uso de antibióticos na suinocultura é resultado das condições de criação em sistemas intensivos, que facilitam a propagação de patógenos entre os animais, fazendo necessária a aplicação regular de antibióticos para garantir a sanidade do plantel.

A grande preocupação relacionada ao uso de antibióticos nesses sistemas produtivos é o risco de desenvolvimento de cepas multirresistentes, que podem migrar para o meio ambiente assim como transferir os genes de resistência antimicrobiana para os patógenos humanos. Associado a isto, pouco se sabe sobre o efeito destes antibióticos nas estações de tratamento de efluentes, principalmente sobre os processos biológicos, que podem ter a sua eficiência alterada pela ação

do antibiótico. Na suinocultura, quando há tratamento do efluente para remoção dos poluentes, são empregados processos biológicos aeróbios ou anaeróbios e, portanto, a presença de antibióticos poderia representar um risco tanto para o processo quanto para a propagação da resistência antimicrobiana entre os microrganismos. O efluente da suinocultura também pode ser depositado diretamente no solo na forma de fertilizante, tornando-se outra forma de acesso do antibiótico ao ambiente.

Apesar dos riscos mencionados, as informações sobre o tipo e a quantidade de antibióticos usados na produção animal são escassas. Estudos realizados por Van Boeckel e colaboradores (2015), baseados no consumo de antibióticos em países desenvolvidos e na densidade de produção animal, estimaram que em 2010 aproximadamente 63 mil toneladas de antibióticos foram consumidas na produção animal com projeção de aumentar em 67% até 2030. Neste mesmo trabalho, foi estimado que a média de consumo na suinocultura é de $172 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de animal produzido, a maior concentração de antibióticos entre os sistemas de produção estudados. No Brasil pouco se sabe sobre o tipo, a frequência e a concentração dos antibióticos usados na suinocultura, sobre a ocorrência de antibióticos nos dejetos suínos ou sobre os efeitos que estes poderiam causar nos sistemas de tratamento de efluentes.

Os antibióticos pertencentes ao grupo das tetraciclina, em especial a tetraciclina e a oxitetraciclina, estão entre os mais utilizados na produção animal mundial (DAGHRIR; DROGUI, 2013). No Brasil, o uso desta classe de antibióticos como promotor de crescimento está vedado desde 2009 (MAPA, IN nº 26). No entanto, continuam a ser usados para o tratamento de doenças no plantel sendo feitas aplicações por curtos períodos de tempo e em doses maiores às que seriam usadas como promotores de crescimento. Assim, poderia haver um risco de alteração dos processos biológicos que ocorrem nos sistemas de tratamento, uma vez que as tetraciclina atuam sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas.

A nitrificação é um processo biológico importante para o tratamento de efluentes da suinocultura, devido à elevada concentração de nitrogênio, sendo realizada por dois grupos de bactérias gram-negativas: nitritantes e nitratantes. As nitritantes, em especial, são conhecidas pela sensibilidade à presença de compostos tóxicos sendo, muitas vezes, consideradas como indicadores de inibidores em sistemas aeróbios e, portanto, poderiam ser inibidas na presença das tetraciclina. Estudos a respeito dos efeitos inibitórios provocados por esta classe de antibióticos sobre microrganismos nitrificantes ainda são escassos e

apresentam resultados controversos, o que justifica o ineditismo e a necessidade do presente trabalho.

O Laboratório de Tratamento Biológico de Resíduos (LTBR) investiga o efeito inibitório de poluentes emergentes sobre bactérias atuantes no tratamento de efluentes desde 2010. Os estudos realizados por Bressan (2012) demonstraram que o antibiótico sulfato de colistina inibe a nitrificação, tanto em processo batelada quanto contínuo. Michels (2016) demonstrou que a etapa de nitrificação é inibida na presença nanopartículas de prata e Perazzoli (2015) avaliou a inibição deste mesmo grupo de bactérias na presença de nanopartículas de ferro. Steinmetz (2016) avaliou o efeito de nove drogas de uso veterinário, dentre elas a tetraciclina e oxitetraciclina, sobre bactérias metanogênicas e observou distintos graus de inibição sobre a comunidade bacteriana e indicativos de processos inibitórios paralelos em alguns casos. Neste contexto, para contribuir com o entendimento dos possíveis efeitos causados pela interação entre antibióticos e microrganismos do tratamento de efluentes, o presente trabalho buscou investigar a inibição da tetraciclina e oxitetraciclina sobre o processo de nitrificação total e parcial.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da presença de drogas de uso veterinário sobre a cinética do metabolismo de culturas de bactérias nitritantes e nitrificantes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer uma cultura mista de bactérias nitritantes em um reator de batelada sequencial de escala laboratorial a fim de obter biomassa para os ensaios cinéticos.
- Estabelecer uma cultura mista de bactérias nitrificantes em um reator de batelada sequencial de escala laboratorial a fim de obter biomassa para os ensaios cinéticos.
- Avaliar o efeito inibitório da exposição a diferentes concentrações de tetraciclina sobre as bactérias nitrificantes e nitritantes utilizando ensaios cinéticos em batelada.
- Avaliar o efeito inibitório da exposição a diferentes concentrações de oxitetraciclina sobre as bactérias nitrificantes e nitritantes utilizando ensaios cinéticos em batelada.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 SUÍNOCULTURA E O MEIO AMBIENTE

O sistema intensivo de produção da suinocultura, resultado da necessidade de aumento da produção para suprir a demanda mundial de carne, tem como principal característica a criação de suínos em sistemas confinados com elevada concentração de animais por área. Apesar de proporcionar ganhos de escala e produtividade, esse sistema também contribui para intensificar a capacidade poluidora da suinocultura através do aumento da produção de dejetos (esterco, urina, restos de ração e água) e pelo dejetos dos mesmos na forma líquida, o que facilita o transporte dos poluentes para os corpos d'água (ITO; GUIMARÃES; AMARAL, 2016; KUNZ, 2006).

Os suínos são animais com elevada capacidade de produção de dejetos, gerando, em média, $47,1 \text{ L}\cdot\text{animal}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$ no ciclo completo (FATMA, 2014). Além da quantidade, a composição deste efluente é um fator preocupante. Os dejetos suínos são caracterizados pela alta carga de compostos orgânicos e nitrogenados, além de conter fósforo e metais pesados como ferro, cobre e zinco. A concentração destes componentes, entretanto, pode variar bastante de acordo com o tipo de manejo e a alimentação animal (Tabela 1) (KUNZ, 2006). Devido ao uso frequente de antibióticos na suinocultura, a presença destes compostos e seus metabólitos vem sendo registrada por diversos autores, com concentrações que variam desde $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ até $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de dejetos suínos (AUST et al., 2008; MARTINEZ-CARBALLO et al. 2007; KIM et al., 2011).

O efluente da suinocultura pode provocar severos impactos ambientais sobre a água, a terra e o ar, caso não sejam manejados de forma correta. No ambiente aquático pode haver a eutrofização de rios e lagos devido à elevada concentração de nutrientes nesse efluente. Como consequência, pode haver o crescimento indiscriminado de algas, morte de peixes e alteração da microbiota aquática. Além disso, há o risco de disseminação de verminoses e outras doenças transmitidas por patógenos suínos que estejam presentes no efluente (ITO; GUIMARÃES; AMARAL, 2016). No solo, quando aplicados em excesso, podem levar à saturação de nutrientes, provocar a lixiviação e o escoamento superficial e interferir no desenvolvimento das plantas devido ao excesso de nutrientes e metais pesados (SEGANFREDO, 1999). O ar pode ser contaminado pela emissão de gases tóxicos, como a amônia, e gases de

efeito estufa como o CO₂, CH₄ e N₂O (ITO; GUIMARÃES; AMARAL, 2016).

Tabela 1 – Composição química observada em dejetos suínos.

Grandeza	Máximo	Mínimo
pH	7,72	6,78
Sólidos Totais (g·L ⁻¹)	99,80	12,70
Sólidos Voláteis (g·L ⁻¹)	79,06	8,43
DQO (g O ₂ ·L ⁻¹)	115,59	11,53
N _{Total} (g·L ⁻¹)	8,75	1,66
P _{Total} (g·L ⁻¹)	2,50	0,32
K (g·L ⁻¹)	1,20	0,26
Cu (mg·L ⁻¹)	38,00	11,00
Zn (mg·L ⁻¹)	416,00	30,00

Fonte: Adaptado de Tavares, 2012.

No Brasil a principal aplicação dos dejetos suínos é na forma de fertilizante para o solo. Esta técnica consiste no armazenamento do dejetos com posterior disposição no solo, a fim de reduzir os custos com fertilizantes industriais na produção de grãos. Além disso, é uma técnica simples e com baixo custo de implantação (MIELE; KUNZ, 2007). No entanto, devido ao grande volume produzido de dejetos e aos impactos ambientais associados a essa prática, outros tipos de tratamentos vêm sendo aplicados. A remoção de matéria orgânica e nutrientes por processos físico-químicos e biológicos em sistemas de tratamento de efluentes é uma dessas alternativas. Dentre os processos que podem ser empregados nesse sistema, a digestão anaeróbia apresenta grandes vantagens do ponto de vista econômico. Seu principal produto, o biogás, pode ser utilizado para produção de energia na forma de calor ou eletricidade dentro da unidade produtora e também pode ser vendido aumentando a receita agropecuária. No entanto, a digestão anaeróbia não é capaz de remover nutrientes como o nitrogênio, fazendo necessária a adição da etapa de nitrificação e desnitrificação para tratamento do efluente final (KUNZ; MIELE; STEINMETZ, 2009).

A compostagem compreende outra alternativa para o manejo dos dejetos. Ela consiste na oxidação biológica da matéria orgânica com liberação de calor e tem como produto final um material sólido e estabilizado, com redução significativa dos patógenos e sem sementes ou ovos de parasitas ativos. Essa tecnologia, assim como a digestão

anaeróbia, não reduz a área de cultivo necessária para aplicação dos dejetos suínos já que não remove os nutrientes, porém facilita a manipulação e minimiza os custos relacionados ao transporte do dejetos por reduzir o volume do mesmo (KUNZ; MIELE; STEINMETZ, 2009).

O elevado consumo de água na suinocultura é outro aspecto que necessita de especial atenção do ponto de vista ambiental. Estima-se que a demanda de água pode chegar a $72,9 \text{ L} \cdot \text{animal}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ no ciclo completo (FATMA, 2014). Os principais fatores que interferem no consumo de água são a qualidade da alimentação, o estado fisiológico e as condições ambientais (ITO; GUIMARÃES; AMARAL, 2016). Como alternativa, sugere-se a reutilização da água obtida ao final do processo de tratamento de efluentes para a limpeza das instalações. Esta prática pode representar uma economia no consumo de água de até 20% (ITO; GUIMARÃES; AMARAL, 2016).

O reuso da água pode trazer sérios riscos para a sanidade dos animais devido à presença de poluentes emergentes (antibióticos e hormônios) e patógenos, que não são completamente removidos no processo (BERNET; BÉLINE, 2009). A presença de patógenos na água de reuso representa um risco à biossegurança da unidade produtora uma vez que contribui para a disseminação de doenças e genes de resistência antimicrobiana (BRESSAN, 2012). O impacto gerado pelos poluentes emergentes necessita de uma análise mais complexa pois a presença destes compostos irá variar de acordo com as propriedades físico-químicas dos mesmos, da frequência com que são usados e das condições ambientais. No caso dos antibióticos, eles podem ocasionar mutação gênica nos microrganismos existentes tanto na etapa produtiva, quanto na estação de tratamento de efluentes, pontos que são tratados com mais detalhes nos itens 3.2.1 e 3.2.2.

3.2 ANTIBIÓTICOS

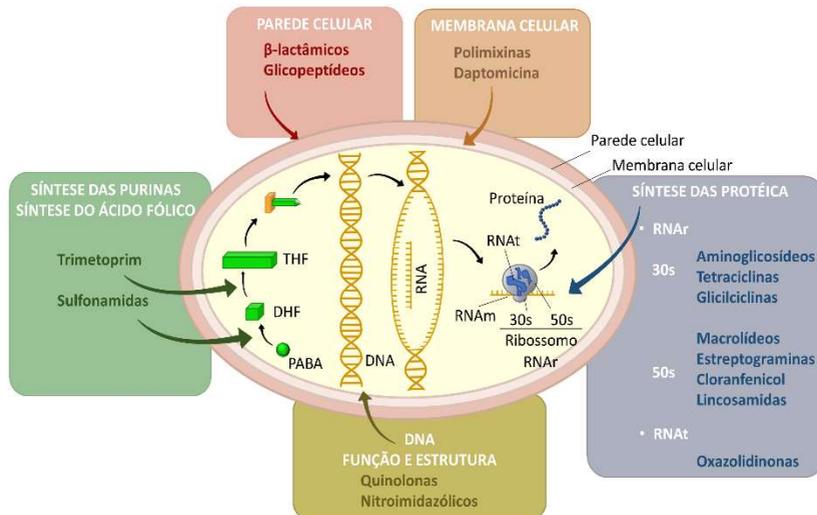
De um modo geral, os antibióticos podem ser definidos como fármacos que atuam sobre o metabolismo de bactérias, fungos e protozoários a fim de inibir o crescimento microbiano ou eliminá-lo. Encontra-se com frequência o uso dos termos antibiótico e antimicrobiano como se fossem sinônimos. No entanto, antimicrobiano refere-se a um amplo grupo de compostos de origem natural ou sintética que também podem atuar sobre vírus. Existem também os quimioterápicos que estão relacionados a tratamentos nos quais ocorre morte celular, incluindo as células cancerígenas (KÜMMERER, 2009a). A princípio, o termo antibiótico estava relacionado somente a drogas

produzidas por microrganismos com a função de inibir o crescimento de outros microrganismos, porém, com o passar dos anos esse termo passou a englobar também produtos de origem sintética e semissintética (NICOLAU; RIGOL, 2017; KÜMMERER, 2009a). Assim, neste trabalho, será considerado como antibiótico qualquer fármaco, independente da sua origem, capaz de matar ou inibir o crescimento de bactérias, fungos e protozoários.

Os primeiros antibióticos foram identificados ao final do século XIX. O ácido micofenólico foi descoberto em 1893 pelo físico italiano Bartolomeo Goizo e é considerado o primeiro antibiótico produzido por fungos (*Penicillium brevicompactum*) a ser obtido em forma cristalina, apesar de atualmente ser empregado somente como imunossupressor devido aos seus efeitos tóxicos (BENTLEY, 2000). Foi apenas na década de 40, após a descoberta da penicilina por Fleming, que o estudo e isolamento de antibióticos a partir de microrganismos foi intensificado (NICOLAU; RIGOL, 2017). Esse período foi marcado pela descoberta das sulfonamidas, tetraciclina, gramicidina, estreptomicina, entre outros.

Os antibióticos podem ser classificados quanto à sua estrutura molecular, mecanismo de ação e ao espectro de atividade antimicrobiana (MADIGAN et al., 2016). Geralmente os mecanismos de ação dos antibióticos interferem em estruturas e processos bioquímicos essenciais para o bom funcionamento do microrganismo (Figura 1). Os β -lactâmicos, por exemplo, interferem na síntese do peptidoglicano, um componente polimérico da parede celular responsável pela estabilidade mecânica da célula. Já as tetraciclina e macrolídeos inibem as sínteses proteicas que ocorrem nas subunidades ribossômicas 30s e 50s, respectivamente. Também há antibióticos que interferem no metabolismo dos ácidos nucleicos, na transcrição do DNA a RNA e na síntese da membrana celular (MADIGAN et al., 2016; MACDOUGALL; CHAMBERS, 2012).

Figura 1 – Principais estruturas e processos bioquímicos afetados pela ação de alguns antibióticos. PABA: ácido paraaminobenzóico; DHF: dihidrofolato; THF: tetrahydrofolato.



Fonte: Adaptado de ANVISA, 2007.

Uma característica comum a todos os antibióticos é a toxicidade seletiva, pois inibem o metabolismo apenas dos microrganismos patogênicos, sem causar efeitos colaterais significativos no organismo hospedeiro ou em microrganismos com características distintas às do patógeno (MADIGAN et al., 2016). Isso contribuiu para a preferência pelo uso dos antibióticos em detrimento de outros fármacos no tratamento de doenças infecciosas. Assim, os antibióticos passaram a ser aplicados na medicina humana, veterinária, agricultura e aquicultura (KÜMMERER, 2009a). Contudo, o uso indiscriminado dos antibióticos levou ao desenvolvimento de mecanismos de defesa nos microrganismos alvo para resistir à ação destes compostos.

A resistência aos antibióticos é uma das principais preocupações em relação à manutenção do uso destes fármacos para o tratamento de doenças infecciosas. Portanto, é essencial conhecer o mecanismo que gera a resistência nos microrganismos para definir estratégias para controlá-la. Porém, assim como acontece com os mecanismos de ação dos antibióticos, os mecanismos de resistência são diversos. Alguns dos mecanismos já reportados na literatura envolvem redução da permeabilidade, alteração do alvo, inativação do antibiótico, desenvolvimento de uma via bioquímica resistente e refluxo (MADIGAN

et al., 2016). Em alguns casos, a resistência pode ocorrer de forma natural, sendo transferida entre organismos de uma mesma espécie através da divisão celular, o que é conhecido como transferência de resistência vertical. A resistência também pode ser desenvolvida durante o contato do microrganismo com o antibiótico e alguns autores a relacionam com a presença dos antibióticos em concentração sub-inibitória (HIRSCH et al., 1999; OHLSEN et al., 1998; SALYERS, 2002). É possível ainda que a resistência seja transferida entre espécies de microrganismos (resistência horizontal) através de unidades móveis do DNA, como os plasmídeos (KÜMMERER, 2009b).

3.2.1 Uso de antibióticos na suinocultura

A evolução do modo de produção de suínos para o sistema intensivo aumentou a ocorrência de problemas sanitários nas granjas em razão da alta densidade de animais confinados em um mesmo ambiente. Nessa condição, os animais ficam submetidos a graus elevados de estresse, respiram um ar poluído pela presença de pó, gases e endotoxinas e ficam mais propensos a adquirir infecções por contaminação cruzada (BARCELLOS et al. 2009). Para viabilizar este modelo produtivo e manter a sanidade do animal, faz-se necessária a aplicação de antibióticos.

Os antibióticos utilizados na suinocultura possuem três propósitos principais: agente terapêutico, preventivo e promotor de crescimento. Quando aplicado para fins terapêuticos, o antibiótico é administrado em doses elevadas, após a instalação da doença. No uso preventivo, são aplicadas doses intermediárias, quando há probabilidade ou risco de infecção bacteriana entre os animais. Já no uso como promotor do crescimento ou aditivo alimentar, o antibiótico é aplicado em doses muito pequenas junto à ração para melhorar o desempenho zootécnico dos animais (AMARAL et al., 2006).

O uso dos antibióticos como promotores de crescimento, estimado em 40% do total de antibióticos consumidos no mundo (HUGHES; HERITAGE, 2004), é uma prática que vem sendo muito questionada pela comunidade. Um dos motivos é o risco de indução da resistência microbiana a esses antibióticos devido ao uso contínuo e em concentrações subletais aos microrganismos. Associado a isto, há também o risco de transferência de genes de resistência entre bactérias de incidência animal e humana, mesmo quando há substituição do antibiótico em questão por um análogo na alimentação animal (CHATTOPADHYAY, 2014; BARTON, 2014). Outro ponto muito

discutido é a presença de resíduos de antibióticos na carne destinada ao consumo humano (LUSK; NORWOOD; PRUITT, 2006).

Como consequência, há uma tendência global de restrição ao uso de antibióticos como promotores de crescimento. Os países pertencentes à União Europeia, desde 2006, proibiram o uso de qualquer tipo de antibiótico como aditivo alimentar (EUROPEAN UNION, 2003). Nos Estados Unidos, onde somente 28% dos antibióticos utilizados na produção de animais estão restritos ao uso terapêutico (FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION, 2016). Porém, a *U.S. Food and Drugs Administration* (FDA) emitiu em 2013 um guia aconselhando à implementação voluntária de planos para eliminar o uso de antibióticos com importância médica como promotores de crescimento, ação que é vista como o primeiro passo para extinção dessa prática nos próximos anos. No Brasil, apesar da escassez de informações sobre o uso de antibióticos na produção animal, algumas medidas vêm sendo tomadas a fim de limitar o uso de antibióticos e outras substâncias como aditivos alimentares (Tabela 2). A mais recente delas refere-se à colistina, usualmente empregada na suinocultura como promotor de crescimento e para tratamento de infecções por *Escherichia coli*. Além disso, outros antibióticos como espiramicina e eritromicina, antes recomendados para o uso como promotores de crescimento em suínos (AMARAL, 2006), também já tiveram seu uso proibido.

Um efeito colateral da restrição de antibióticos como promotores de crescimento é o aumento do seu uso com finalidade terapêutica. Tal comportamento foi observado em países da União Europeia e alguns autores o relacionam com o aumento da incidência de infecções sobre as criações de animais (CASEWELL, 2003; AARESTRUP, 2008). No Reino Unido, por exemplo, a venda de antibióticos veterinários para uso como promotor de crescimento foi banida em 1999 e foi observado, entre 1999 e 2000, um aumento do consumo de antibióticos para fins terapêuticos em 64 toneladas, dos quais 36 t eram referentes aumento no consumo de tetraciclinas (VETERINARY MEDICINES DIRECTORATE, 2001).

Tabela 2 – Substâncias proibidas para uso como promotores de crescimento de acordo com a legislação brasileira vigente.

Substância	Legislação
Organoclorados	Portarias nº 329/1985 e 191/1986
Avoparcina	Of. Circ. DFPA nº 047/1998
Arsenicais e antimoniais	Portaria nº 31, 29/01/2002
Cloranfenicol e Nitrofuranos	IN nº 09, 27/06/2003
Substâncias com efeito tireostático, androgênico, estrogênico, gestagênico e β -agonista em aves	IN nº 17, 18/06/2004
Olaquinox	IN nº 11, 24/11/2004
Cabadox	IN nº 35, 14/11/2005
Violeta de genciana	IN nº 34, 13/09/2007
Anfenicóis, tetraciclina, β -lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), quinolonas e sulfonamidas sistêmicas	IN nº 26, 09/07/2009 (Portaria nº 193/1998)
Substâncias, naturais ou artificiais, com atividade anabolizante hormonal em bovinos de abate	IN nº 55, 01/12/2011
Espiramicina e eritromicina	IN nº 14, 17/05/2012
β -agonista em bovinos	Ato nº 01, 01/11/2012
Colistina	IN Nº 45, 22/11/2016

Fonte: MAPA, 2017.

A aplicação de antibióticos para fins terapêuticos e preventivos também contribui para o aumento do risco de resistência antimicrobiana. Nesses casos, os antibióticos são administrados por um período de 5 a 10 dias, no entanto, o seu uso pode ser repetido durante todo o período de crescimento do animal. Além disso, o antibiótico pode ser associado à aplicação de outros fármacos em concentrações muito superiores às utilizadas para promover o crescimento (BARTON, 2014).

3.2.2 Ocorrência de antibióticos em sistemas de tratamento de efluente e suas consequências

Uma preocupação recorrente no que diz respeito à aplicação indiscriminada de antibióticos na suinocultura, assim como nos demais sistemas intensivos de produção, é o potencial de contaminação ambiental por essas moléculas. A grande razão para isso é o caráter recalcitrante de grande parte desses compostos, que muitas vezes são excretados pelos animais ainda na forma ativa (JJEMBA, 2006). Deste modo, eles podem atingir ambientes terrestres e aquáticos, como também os sistemas biológicos de tratamento de efluentes. Nestes sistemas, eles podem alterar a composição da comunidade microbiana e interferir no metabolismo destes microrganismos (KÜMMERER, 2009a).

Nos sistemas de tratamento de efluentes, os processos biológicos podem ser inibidos por diferentes antibióticos. No entanto, a ação inibitória irá variar de acordo com diversos fatores como o tipo de antibiótico, a composição do meio, a comunidade bacteriana, tempo de exposição, temperatura, pH, entre outros, o que dificulta a previsão do impacto ambiental gerado. Halling-Sørensen e colaboradores (2000) avaliaram o efeito da mecillinam, ciprofloxacina e trimetoprima em lodos ativados. Eles constataram que a ciprofloxacina foi extremamente tóxica sobre a comunidade microbiana, sendo capaz de inibir a atividade destas bactérias em 50% (CI-50) a uma concentração de $0,61 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Já a mecillinam e trimetoprima apresentaram toxicidade significativamente inferior, com CI-50 de $61,1$ e $17,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Já Liu e colaboradores (2013) observaram os efeitos tóxicos da ciprofloxacina em culturas desnitrificantes, sulfato redutoras e metanogênicas e obtiveram diferentes efeitos inibitórios sobre essas comunidades bacterianas. Na metanogênese a ciprofloxacina, na concentração de $80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, provocou uma redução da produção de metano em 30%; em relação às bactérias redutoras de sulfato observou-se, a princípio, uma forte inibição na produção de sulfeto de hidrogênio que foi amenizada ao longo do período de incubação; a desnitrificação, no entanto, não foi inibida pela presença do antibiótico.

O tempo de exposição das comunidades microbianas aos antibióticos é um fator muito importante para avaliar a inibição destes compostos nos processos biotecnológicos. Os testes de inibição indicam que longos tempos de exposição apresentam efeitos mais danosos que ensaios com períodos menores, pois, nessa condição, é possível observar inibição em concentrações mais baixas que as observadas nos testes com tempos de exposição menores (KÜMMERER, 2009a). Além de inibir o

processo, longos tempos de exposição podem modificar a composição da comunidade microbiana e induzir a seleção de linhagens resistentes, que podem transferir os genes de resistência aos patógenos presentes no meio (BRESSAN, 2012).

A nitrificação é um processo especialmente importante para o tratamento de efluentes da suinocultura, devido às cargas elevadas de nitrogênio amoniacal características a este efluente. No entanto, a presença de antibióticos é um fator preocupante para o processo, uma vez que as bactérias nitrificantes são sensíveis à presença de compostos tóxicos. Assim, já foram publicados alguns trabalhos indicando a inibição da atividade bacteriana na presença de antibióticos. Campos e colaboradores (2001) observaram inibição da nitrificação na presença de oxitetraciclina na concentração de $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, alcançando inibição de 50% do processo com $250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ do composto. Huang e colaboradores (2016) verificaram a inibição de dez antibióticos pertencentes ao grupo das sulfonamidas sobre a atividade de bactérias nitrificantes. Os ensaios de toxicidade mostraram diferentes valores de CI-50 para estes compostos, variando de $80,84 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para a sulfadimetoxina até $214,65 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para a sulfadimina. Bressan (2012) avaliou o efeito inibitório da colistina sobre a nitrificação e a nitratação além de diferenciar o efeito do tempo de exposição a curto e longo prazo. Ele observou que a nitrificação completa não foi afetada significativamente na presença da colistina em curto tempo de exposição (5 h), no entanto em ensaios com duração de 150 dias foi observado que $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ do antibiótico provocou perda gradativa da atividade celular até a paralização do processo; já a nitrificação parcial foi inibida em 50% com $10,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ do antibiótico em ensaios de 5h. Katipoglu-yazan e colaboradores (2015) também identificaram maior sensibilidade das bactérias nitrificantes em relação às nitrificantes na presença de $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de tetraciclina havendo redução das nitrificantes em 97% em relação à composição microbiana inicial.

Um ponto muito discutido é a capacidade de remoção dos antibióticos em sistemas de tratamento de efluentes. Embora algumas plantas de tratamento sejam capazes de remover esses compostos durante o processo, a eficiência de remoção pode variar entre cada estação de tratamento, devido à variedade de compostos com propriedades distintas e às condições operacionais (KIM; AGA, 2007; MICHAEL et al., 2013). Para as tetraciclina, por exemplo, já foram reportados na literatura eficiências de remoção variando de 12 até 80% em sistemas convencionais (DAGHRIR; DROGUI, 2013). Se não forem removidos ao final do processo, os antibióticos são descartados no ambiente podendo atingir o solo e águas superficiais e subterrâneas contaminando inclusive

a água potável (Figura 2). Nesses ambientes eles podem induzir aos mesmos efeitos reportados nos sistemas de tratamento de efluentes, a saber, resistência antimicrobiana, inibição de processos biológicos e alteração da microbiota.

Figura 2 – Possíveis fontes e caminhos para a ocorrência de antibióticos no meio ambiente.



Fonte: Do autor.

3.3 TETRACICLINAS

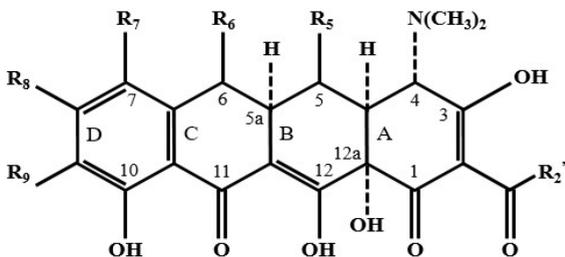
As tetraciclina compreendem um grupo de antibióticos de amplo espectro com ação bacteriostática e que podem ser de origem natural ou sintética. Dentre os microrganismos suscetíveis à tetraciclina podem ser citados bactérias gram-positivas e gram-negativas, protozoários, micoplasmas e clamídias (CHOPRA & ROBERTS, 2001).

A primeira integrante deste grupo, a clortetraciclina, foi descoberta por Benjamin Duggar em 1945 como sendo um produto da fermentação da *Streptomyces aureofaciens*, bactéria encontrada no solo (PEREIRA-MAIA et al., 2010). Em seguida, outras tetraciclina, também obtidas por bactérias do gênero *Streptomyces*, foram isoladas e identificadas, como a tetraciclina (*S. aureofaciens*, *S. rimosus* e *S. viridofaciens*), oxitetraciclina (*S. rimosus*) e demetil-clortetraciclina (*S.*

aureofaciens) (CHOPRA & ROBERTS, 2001). A produção sintética de tetraciclina, como a doxiciclina, minociclina e metaciclina, se dá pela modificação dos radicais das moléculas de ocorrência natural (NELSON, 1998).

Todas as moléculas de tetraciclina são formadas por um núcleo tetracíclico, com quatro anéis condensados denominados A, B, C e D, aos quais são ligados diferentes grupos funcionais, como mostra a Figura 3 e a Tabela 3. Esta estrutura química está diretamente relacionada à ação biológica dessas moléculas. Estudos realizados por Colaizzi, Knevel e Martin em 1965 mostraram que a configuração do carbono C4 em sua forma natural é fundamental para a atividade antimicrobiana das tetraciclina, assim como a presença do grupamento amida no carbono C2 (posição R₂' na Figura 3). Outros grupos funcionais essenciais para a atividade antimicrobiana das tetraciclina são o sistema ceto-enólico nas posições C11, C12 e C12a, os substituintes nas posições C7, C8 e C9 e o próprio núcleo tetracíclico (CHOPRA & ROBERTS, 2001; PEREIRA-MAIA et al., 2010).

Figura 3 – Estrutura geral das moléculas de tetraciclina.



Fonte: Adaptado de Chopra e Robert, 2001.

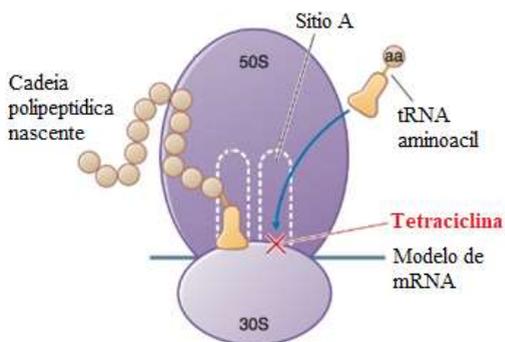
A estrutura complexa observada nas tetraciclina confere a estas moléculas grande afinidade para se ligar a cátions metálicos gerando quelatos. Estes quelatos são formados devido à presença de vários grupos doadores de elétrons, como os oxigênios entre os carbonos C10 e C12, o oxigênio enólico em C3 e os nitrogênios do grupo amina e amida do anel A (PEREIRA-MAIA et al., 2010). Essa propriedade é extremamente importante do ponto de vista biológico, pois influencia as propriedades antimicrobianas e farmacocinéticas das tetraciclina. Diversos estudos na literatura já mostraram que os quelatos formados entre a tetraciclina e magnésio ou cálcio podem diminuir a capacidade de absorção do antibiótico em mamíferos. Estes quelatos também podem aumentar a

atividade antimicrobiana frente a bactérias, pois facilitam a entrada dessas moléculas pela membrana celular e a ligação da droga ao ribossomo bacteriano (CHOPRA & ROBERTS, 2001; NELSON, 1998; NEUVONEN, 1976).

O modo de ação das tetraciclina já está bem descrito na literatura. Primeiramente há o transporte do fármaco para o citoplasma bacteriano, cujo mecanismo varia de acordo com a estrutura da membrana celular. Em bactérias gram-negativas, essa etapa ocorre tanto por difusão passiva, quando o fármaco (na forma de um quelato) penetra a membrana celular externa através dos canais hidrofílicos formados por proteínas, quanto pelo transporte ativo de bombeamento das tetraciclina em forma livre através da membrana citoplasmática. Já nas bactérias gram-positivas esse processo se dá somente pelo transporte ativo, havendo gasto energético da célula (MACDOUGALL; CHAMBERS, 2012; NELSON, 1998).

Uma vez dentro do citoplasma, as tetraciclina tendem a formar novamente quelatos com os íons presentes no meio devido às concentrações destes e ao pH intracelular. O quelato magnésio-tetraciclina, em especial, é considerado um dos principais responsáveis pela ação inibitória da tetraciclina, pois esta forma ativa liga-se de maneira reversível à subunidade 30S do ribossomo bacteriano impedindo a ligação do aminoacil-t-RNA no sítio A desta organela (Figura 4). Consequentemente, o aminoácido carregado pelo aminoacil-t-RNA não pode ser adicionado à cadeia polipeptídica em formação e a síntese proteica é inibida (CHOPRA & ROBERTS, 2001; MACDOUGALL & CHAMBERS, 2012; NELSON, 1998).

Figura 4 – Esquema ilustrativo do mecanismo de ação das tetraciclina.



Fonte: Adaptado de MacDougall e Chambers, 2012.

As tetraciclinas são conhecidas por serem compostos de baixa estabilidade, especialmente em ambientes com temperatura elevada, pH alcalino ou ácido e umidade. Em solução ácida, elas sofrem epimerização, uma reação reversível e de primeira ordem, no carbono C4 podendo gerar diversos produtos de degradação. Já em soluções básicas, elas sofrem mudanças profundas em sua estrutura ocorrendo clivagem no carbono C6 (HALLING-SØRENSEN, 2002). Os principais produtos de degradação para as tetraciclinas mais comuns estão apresentados na Tabela 3. Existe uma grande preocupação em relação a estes compostos, pois muitos deles ainda apresentam atividade antimicrobiana, podendo haver mudança do mecanismo de ação em relação à tetraciclina de origem. Este é o caso das tetraciclinas atípicas como a 5a,6-anidrotetraciclina, 4-epi-anidro-tetraciclina, 5a,6-anidroclortetraciclina e 4-epi-anidro-clortetraciclina. Elas apresentam efeito bactericida sobre as células pois interferem na permeabilidade da membrana levando à lise celular e também são tóxicos a microrganismos que, a princípio, seriam resistentes à tetraciclina de origem (OLIVA et al., 1992; HALLING-SØRENSEN, 2002).

Tabela 3 – Principais produtos de degradação da tetraciclina (TC), oxitetraciclina (OTC) e clortetraciclina (CTC).

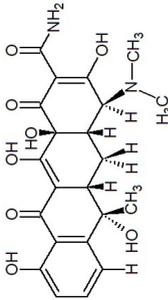
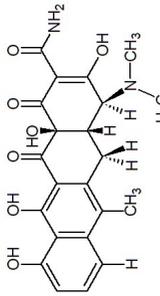
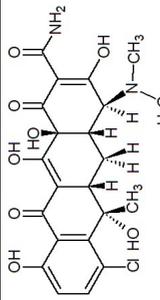
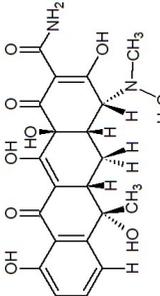
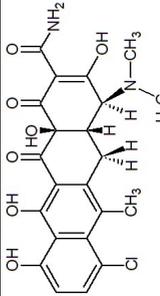
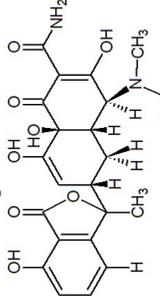
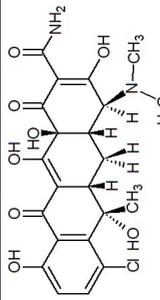
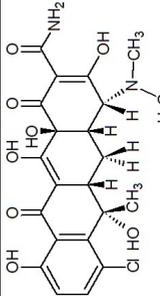
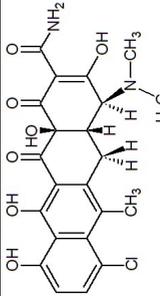
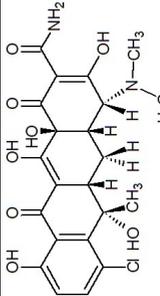
Molécula	Produtos de degradação
 <p data-bbox="535 1225 561 1353">Tetraciclina</p>	 <p data-bbox="434 775 460 967">Anidrotetraciclina</p>
 <p data-bbox="848 1206 874 1369">Clortetraciclina</p>	 <p data-bbox="434 328 460 504">4-epitetraciclina</p>
 <p data-bbox="639 751 665 991">4-epi-anidrotetraciclina</p>	 <p data-bbox="639 328 665 504">4-epitetraciclina</p>
 <p data-bbox="848 759 874 983">Anidrocortetraciclina</p>	 <p data-bbox="639 336 665 496">Iso-tetraciclina</p>
 <p data-bbox="848 759 874 983">4-epi-clortetraciclina</p>	 <p data-bbox="848 312 874 520">4-epi-clortetraciclina</p>

Tabela 3 (Continuação) – Principais produtos de degradação da tetraciclina (TC), oxitetraciclina (OTC), oxitetraclina (OTC) e clortetraciclina (CTC).

Molécula	Produtos de degradação	
<p>Clortetraciclina</p>	<p>4-epi-anidroclortetraciclina</p>	<p>Iso-clortetraciclina</p>
<p>Oxitetraciclina</p>	<p>Anidrooxitetraciclina</p>	<p>4-epioxitetraciclina</p>
	<p>4-epianidrooxitetraciclina</p>	<p>Iso-oxitetraciclina</p>
		<p>Ácido terracínico</p>

3.3.1 Uso e ocorrência em águas residuais

As tetraciclinas são o segundo grupo de antibióticos mais produzidos e consumidos no mundo (MICHALOVA; NOVOTNA; SCHLEGLOVA, 2004; DAGHRIR; DROGUI, 2013). A capacidade de inibir o metabolismo de um amplo espectro de microrganismos patogênicos e os efeitos não relacionados à ação antimicrobiana como anti-inflamatório, imunossupressor, cicatrizante, entre outros, são alguns dos motivos que levaram ao uso tão bem-sucedido deste grupo. Além disso, o baixo custo de produção torna estes antibióticos ainda mais atrativos para os países em desenvolvimento (BORGHI; PALMA, 2014; DAGHRIR; DROGUI, 2013).

As tetraciclinas são o grupo de antibióticos mais utilizados na medicina veterinária e sua principal aplicação ocorre nos sistemas de produção intensiva de animais. Nestes processos, as tetraciclinas podem ser aplicadas com finalidade profilática ou terapêutica, de acordo com as leis em vigor em cada país. No Brasil, entretanto, o uso da tetraciclina como promotor de crescimento em animais está proibido desde 2009, quando entrou em vigor a Instrução Normativa N° 26 do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2009).

Associado ao uso indiscriminado na medicina humana, veterinária e agricultura, as tetraciclinas são compostos com baixa taxa de conversão no corpo animal. Jjemba (2006) monitorou dados de biodisponibilidade e proporção excretada de diversos produtos farmacêuticos. Neste trabalho ele verificou que mais de 70% das tetraciclinas administradas são eliminadas do organismo animal, ainda em sua forma ativa. Assim, a ocorrência de diferentes tipos de tetraciclinas em águas residuais é comum e já foi reportada em muitos países (Tabela 4). Elas também podem alcançar o meio-ambiente pelas mesmas vias que os demais antibióticos e, uma vez no ambiente, podem induzir à resistência microbiana dos organismos ali presentes.

Tabela 4 – Ocorrência de tetraciclinas em diferentes tipos de efluente.

Antibiótico	Concentração (ng/L)	Tipo de efluente	Localização	Referência
Clortetraciclina	310	Doméstico	Wisconsin, USA	Karhikeyan; Meyer (2006)
Clortetraciclina	178 ± 180	Doméstico	Michigan, EUA	Gao et al. (2012)
Clortetraciclina	459	Industrial	Mosul, Iraque	Ibraheem; Abdul-Ahad (2012)
Clortetraciclina	$(1,8 \pm 0,5) \cdot 10^6$	Industrial	China	Hou et al. (2015)
Clortetraciclina	2.821	Suinocultura	Taiwan	Lin; Yu; Lin (2008)
Doxiciclina	10	Doméstico	Wisconsin, EUA	Karhikeyan; Meyer (2006)
Doxiciclina	nd - 161,8	Doméstico	Dalian, China	Zhang et al. (2017)
Doxiciclina	38	Doméstico	Canadá	Miao et al. (2004)
Doxiciclina	738 ± 557	Doméstico	Michigan, EUA	Gao et al. (2012)
Oxitetraciclina	nd – 1.163,8	Doméstico	Dalian, China	Zhang et al. (2017)
Oxitetraciclina	72,5	Doméstico	Beijing, China	Jia et al. (2009)
Oxitetraciclina	47.000	Doméstico	Wisconsin, EUA	Karhikeyan; Meyer (2006)
Oxitetraciclina	29 ± 18	Doméstico	Michigan, EUA	Gao et al. (2012)
Oxitetraciclina	$(334,3 \pm 43,2) \cdot 10^6$	Industrial	China	Hou et al. (2015)
Oxitetraciclina	8318	Suinocultura	Taiwan	Lin; Yu; Lin (2008)
Oxitetraciclina + Tetraciclina	2.500 – 410.000	Suinocultura	Iowa e Ohio, EUA	Campagnolo, et al. (2002)
Tetraciclina	nd - 462,7	Doméstico	Dalian, China	Zhang et al. (2017)
Tetraciclina	6.240	Doméstico	Elazig, Turquia	Topal; Topal (2015)
Tetraciclina	48.000	Doméstico	Wisconsin, EUA	Karhikeyan; Meyer (2006)

nd: não detectado

Tabela 4 (Continuação) – Ocorrência de tetraciclina em diferentes tipos de efluente.

Antibiótico	Concentração (ng/L)	Tipo de efluente	Localização	Referência
Tetraciclina	16,5	Doméstico	Beijing, China	Jia et al. (2009)
Tetraciclina	151	Doméstico	Canadá	Miao et al. (2004)
Tetraciclina	200	Doméstico	Fort Collins, USA	Yang; Cha; Carlson (2005)
Tetraciclina	310 ± 92	Doméstico	Michigan, EUA	Gao et al. (2012)
Tetraciclina	(61,0 ± 12,2) · 10 ⁶	Industrial	China	Hou et al. (2015)
Tetraciclina	1.129	Suinocultura	Taiwan	Lin; Yu; Lin (2008)

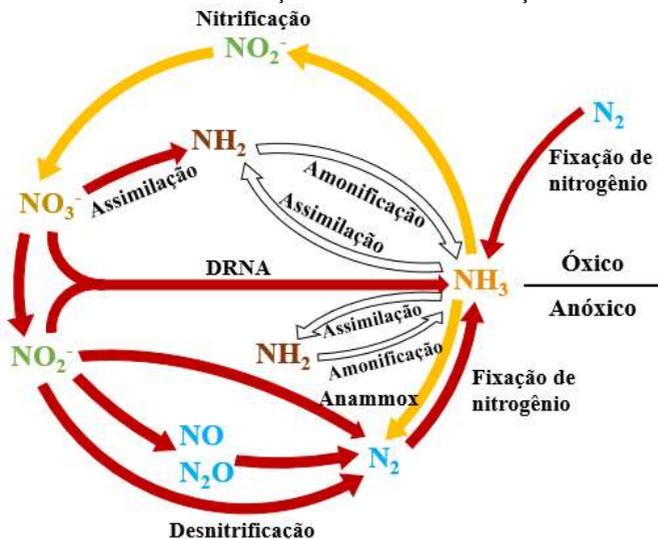
nd: não detectado

3.4 CICLO BIOQUÍMICO DO NITROGÊNIO

O nitrogênio é um elemento chave para o controle da composição, diversidade, dinâmica e o funcionamento de espécies presentes em muitos ecossistemas (VITOUSEK et al., 1997). Uma das razões para isso é a sua presença na estrutura química de proteínas e ácidos nucleicos das células animais, vegetais e microbianas (BITTON, 2005). Além disso, a sua forma gasosa – o N₂ – constitui 79% dos gases presentes na atmosfera, o que torna este gás um importante reservatório de nitrogênio apesar de ser de incorporação lenta e difícil (SCHIMIDELL et al., 2007).

Na natureza é possível encontrar diversos compostos nitrogenados devido aos estados de oxidação do nitrogênio, cuja valência varia de -3 na amônia (NH₃) e no nitrogênio orgânico (R-NH₂) até +5 no nitrato (NO₃⁻). As transformações entre as formas nitrogenadas são, em sua grande maioria, dependentes da ação de microrganismos e compreendem os processos de fixação, nitrificação, desnitrificação, oxidação anaeróbia de amônia (anammox) e redução dissimilativa do nitrato para amônia (DRNA) (SCHIMIDELL et al., 2007; MADIGAN et al., 2016). Na Figura 5, estão apresentados os principais processos envolvidos no ciclo do nitrogênio.

Figura 5 – Esquema representativo do ciclo bioquímico do nitrogênio. Setas amarelas indicam reações de oxidação, vermelhas indicam reações de redução e as brancas não há modificação do número de oxidação.



Fonte: Adaptado de Madigan et. al., 2016.

Uma vez que o nitrogênio gasoso não é assimilado pela grande maioria dos seres vivos, ele precisa ser convertido a uma forma biologicamente ativa. O processo responsável por essa conversão é conhecido como fixação e é realizado por microrganismos procariotos que podem ser encontrados na natureza em forma livre (ex. *Azotobacter*, *Beijerinckia* e *Clostridium*) ou em associação simbiótica com as raízes de plantas leguminosas (ex. *Rhizobium*, *Frankia* e *Bradyrhizobium*).

A amônia, além de ser um produto do processo de fixação, também pode ser obtida através da amonificação. Neste processo, os grupamentos amina dos aminoácidos presentes em células mortas ou nos dejetos de animais são removidos e convertidos em amônia através da ação de bactérias e fungos decompositores (BERNHARD, 2010). Em contrapartida, o consumo da amônia ocorre nas etapas de assimilação e nitrificação. Na assimilação o NH_3 atua como substrato para enzimas da própria célula na formação das proteínas que fazem parte da estrutura celular. Na nitrificação, que ocorre em condições aeróbias, a amônia é convertida a nitrito (NO_2^-) pela ação das bactérias oxidadoras de amônia (BOA) e, em seguida, o NO_2^- é oxidado a nitrato (NO_3^-) pela ação das bactérias oxidadoras de nitrito (BON).

Por fim, o nitrato, formado na nitrificação, é usado como acceptor final da cadeia de elétrons em condições anóxicas por algumas bactérias heterotróficas, como as do gênero *Pseudomonas*. Esse processo é conhecido como desnitrificação e tem como produto principal o N_2 , podendo gerar também outros gases como o NO e N_2O , que contribuem para a destruição da camada de ozônio e para formação da chuva ácida (MADIGAN, 2016).

Ao longo dos últimos anos, importantes pesquisas foram desenvolvidas a fim de se conhecer melhor o ciclo do nitrogênio e, graças a elas, novos processos puderam ser adicionados a este ciclo. Um destes processos é conhecido como redução dissimilatória de nitrato a amônia (DRNA) e se distingue do processo assimilatório por não ser afetado pela concentração de amônia e ser regulado pelo oxigênio, ocorrendo em condições anaeróbias. Os principais organismos que realizam esse processo são bactérias fermentadoras que competem com as desnitrificantes pelo nitrato e que são favorecidas em condições de razão C/N elevadas (TIEDJE, 1982; TIEDJE, 1988).

O processo Anammox (do inglês, *Anaerobic Ammonium Oxidation*), patenteado em 1995 por Mulder e colaboradores, constitui uma rota alternativa para promover a desnitrificação em ambiente anaeróbio. Nele, o íon amônio é oxidado a gás nitrogênio tendo o nitrito como acceptor de elétrons (MULDER et al., 1995). A reação é realizada por microrganismos autotróficos, preferencialmente bactérias, que apresentam velocidades de crescimento muito baixas e são extremamente sensíveis, sofrendo inibição na presença de oxigênio e em concentrações de nitrito superiores a $100 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$ (SCHIMIDELL et al., 2007).

As atividades humanas, como agricultura, pecuária e a queima de combustíveis fósseis, provocam alterações nas frações dos compostos nitrogenados presentes nas diferentes esferas do sistema terrestre e, assim, modificam significativamente o equilíbrio do ciclo do nitrogênio. A utilização de fertilizantes em excesso para aumentar a produção agrícola, por exemplo, é capaz de aumentar a concentração de compostos nitrogenados no solo. Uma vez no solo, estes compostos podem ser transportados para correntes de água fluvial e subterrânea, podendo levar à eutrofização dos rios, criação de zonas anóxicas e alteração da biota aquática (BERNHARD, 2010). De modo semelhante, a criação intensiva de animais contribui para o desequilíbrio do ciclo do nitrogênio devido à geração de dejetos com elevadas cargas de compostos nitrogenados, dos quais 90% encontram-se na forma de amônia (LIAO; CHEN; LO, 1995). A combustão de combustíveis fósseis, por sua vez, é responsável pela

formação de óxidos de nitrogênio que são solubilizados em contato com a água e retornam à hidrosfera na forma de nitratos (EPA, 1993).

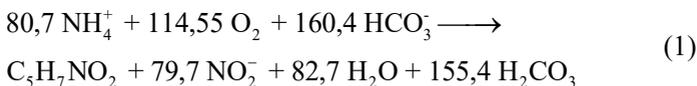
3.4.1 Nitrificação no tratamento de efluentes

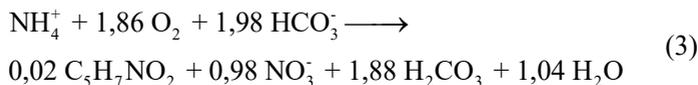
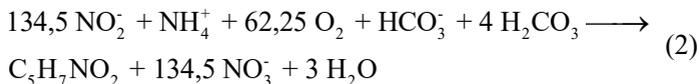
A nitrificação, assim como outras etapas do ciclo do nitrogênio, pode ser empregada para a remoção de compostos nitrogenados em plantas de tratamento de efluentes. O processo convencional para eliminação de nitrogênio de águas residuais compreende uma etapa de nitrificação seguida pela etapa de desnitrificação. Deste modo, primeiro ocorre a oxidação do nitrogênio amoniacal a nitrato, na presença de oxigênio, por bactérias nitrificantes, seguida pela redução do nitrato a nitrogênio gasoso em ambiente anóxico por bactérias desnitrificantes (SCHIMIDELL et al., 2007).

A nitrificação é entendida como a etapa limitante da remoção de nitrogênio (SCHIMIDELL et al., 2007). Algumas das razões para isso são o baixo crescimento celular e sua inibição por diversos compostos. Além disso as condições operacionais como temperatura, pH, oxigênio dissolvido e composição do meio exercem grande influência sobre a atividade das bactérias nitrificantes (METCALF; EDDY, 2003).

As bactérias nitrificantes são estritamente autotróficas e podem ser divididas em dois grandes grupos: as bactérias oxidadoras de amônia (BOA) que realizam a etapa de oxidação da amônia a nitrito e as bactérias oxidadoras de nitrito (BON) que oxidam o nitrito a nitrato. Dentre as BOAs, o gênero mais frequente nas estações de tratamento de efluentes é o *Nitrosomonas*, podendo existir também *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobus* e *Nitrosorobrio*. Já entre as BONs as bactérias do gênero *Nitrobacter* são as mais comuns, podendo existir também *Nitrococcus*, *Nitrospira*, *Nitrospina* e *Nitrocystis* (METCALF; EDDY, 2003; RITTMANN; MCCARTY, 2001).

As etapas da nitrificação foram descritas em termos de crescimento celular por Henze e colaboradores (1997) e estão apresentadas nas Equações 1 e 2. A primeira delas, também conhecida como nitrificação, ocorre pela ação das BOAs, enquanto a segunda etapa, conhecida como nitratação, é realizada pelas BONs. Unindo as duas equações é possível obter a equação global para a nitrificação, apresentada na Equação 3.





Observa-se, pelas equações 1 e 2, que nas duas etapas há geração de íons H^+ (expresso na forma do H_2CO_3) e consumo de alcalinidade (expresso na forma de HCO_3^-) levando à queda do pH ao longo do processo. O consumo de alcalinidade pode ser estimado pela estequiometria da Equação 3 sendo $11,88 \text{ mg NaHCO}_3 \cdot (\text{mg N-NH}_4^+)^{-1}$. Também é possível calcular o rendimento teórico de biomassa para a oxidação da amônia em todo o processo de nitrificação. Esse valor é expresso em função da quantidade de sólidos suspensos voláteis (SSV) por nitrogênio amoniacal oxidado (N-NH_4^+), podendo haver formação de $0,161 \text{ mg SSV} \cdot (\text{mg N-NH}_4^+)^{-1}$, dos quais $0,100 \text{ mg SSV}$ são obtidos somente na etapa de nitrificação.

Outro fator muito importante que pode ser avaliado a partir destas equações é o consumo de oxigênio. Para o processo de nitrificação completa há consumo de $4,25 \text{ mg O}_2 \cdot (\text{mg N-NH}_4^+)^{-1}$ enquanto que para a etapa de nitrificação este consumo é reduzido para $3,24 \text{ mg O}_2 \cdot (\text{mg N-NH}_4^+)^{-1}$. Este valor representa uma economia de 25% de oxigênio consumido no processo, o que justifica o crescente interesse em promover a oxidação da amônia somente até nitrito (SCHIMIDELL et al., 2007).

Durante o processo de nitrificação existem diversas variáveis que devem ser controladas a fim de garantir o bom desempenho das células. O pH é uma dessas variáveis e seu controle é muito importante por estar associado ao equilíbrio entre as espécies químicas amônia livre (NH_3) e amônio (NH_4^+), assim como nitrito e ácido nitroso. Esses equilíbrios são descritos pelas equações desenvolvidas por Anthonisen e colaboradores (1976) (Equações 4 e 5).

$$[\text{NH}_3] = \frac{17}{14} \times \frac{([\text{N-NH}_3] + [\text{N-NH}_4^+]) \times 10^{\text{pH}}}{e^{(6344/273 + T)} + 10^{\text{pH}}} \quad (4)$$

$$[\text{HNO}_2] = \frac{46}{14} \times \frac{[\text{N-NO}_2^-]}{e^{(-2300/273+T)} \times 10^{\text{pH}}} \quad (5)$$

Sendo $[\text{NH}_3]$ a concentração de amônia em $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $[\text{N-NH}_3]$ e $[\text{N-NH}_4^+]$ as concentrações de nitrogênio amoniacal em $\text{mg}\cdot\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$; $[\text{HNO}_2]$ a concentração de ácido nitroso em $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $[\text{N-NO}_2^-]$ a concentração de nitrito em $\text{mg}\cdot\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$ e T a temperatura em $^\circ\text{C}$.

De acordo com a equação 4, o aumento do pH favorece a presença da amônia em sua forma livre (NH_3), que é o verdadeiro substrato da nitrificação. No entanto, devido ao seu caráter tóxico, principalmente sobre as culturas de BONs, valores de pH superiores a 8,5 podem levar à inibição do processo dependendo da concentração de nitrogênio amoniacal total no meio (SCHIMIDELL et al., 2007). Ao trabalhar em pH inferior a 7,0 o processo pode ser inibido tanto pela ausência de amônia na forma livre quanto pelo favorecimento do HNO_2 no equilíbrio $\text{HNO}_2/\text{NO}_2^-$, já que o HNO_2 é capaz de inibir a atividade das bactérias nitrificantes em concentrações entre 0,22 e 2,8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (ANTHONISEN et al., 1976). Assim o pH ótimo de operação é entre 7,5 e 8,0 (METCALF & EDDY, 2003).

Pelas Equações 4 e 5 também se observa que há interferência da temperatura sobre o equilíbrio das espécies químicas. Além disso, a temperatura tem influência direta sobre a velocidade de crescimento celular, havendo aumento da mesma com o aumento da temperatura. Como as bactérias nitrificantes são, na maioria dos casos, bactérias mesofílicas, a temperatura ideal de trabalho deve ser entre 28 e 36 $^\circ\text{C}$. No entanto, as BOAs possuem velocidade de crescimento maior que as BONs em temperaturas elevadas o que torna a temperatura um dos critérios para seleção de biomassa dentro do reator (BERNET; SPÉRANDIO, 2009).

Como já foi mencionado, as bactérias nitrificantes são aeróbias e, portanto, concentrações baixas de oxigênio dissolvido (OD) podem limitar o processo de nitrificação. No entanto, a inibição sofrida pelas BONs devido à baixa concentração de OD é mais pronunciada que a inibição sobre as BOAs o que pode levar ao acúmulo de nitrito em condições com OD próximo a 0,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (BERNET; SPÉRANDIO, 2009).

3.4.2 Nitrificação parcial no tratamento de efluentes

Conforme já foi afirmado, a aplicação da nitritação ou nitrificação parcial nos sistemas de tratamento de efluentes vem ganhando

destaque nos últimos anos, especialmente quando se possui um efluente com elevada concentração de amônia. Estes processos visam eliminar a etapa de nitratação, pois assim reduz-se o consumo de oxigênio e de carbono orgânico adicionado na etapa de desnitrificação, fatores que representam economia significativa para o processo. No entanto, ao realizar a nitrificação parcial deve-se garantir um processo com alta eficiência de remoção do nitrito, pois este é mais tóxico para o meio ambiente do que o nitrato (SCHIMIDELL et al., 2007).

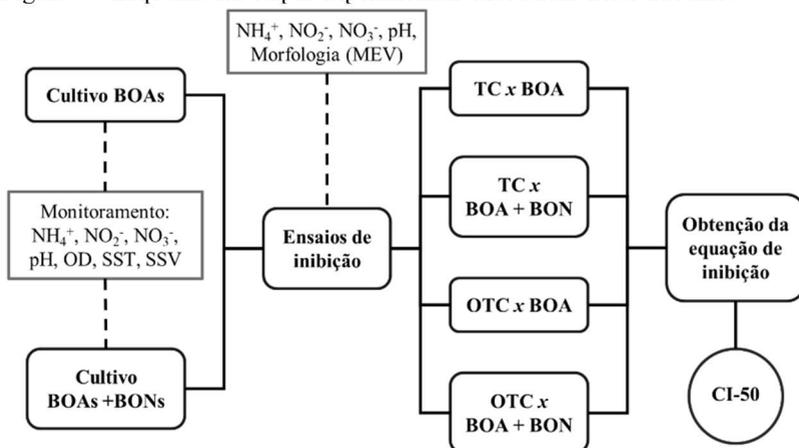
A principal maneira para eliminar a etapa de nitratação é limitar o crescimento das BONs e para isso diferentes estratégias podem ser empregadas. Estas estratégias incluem aumento da temperatura, limitação do fornecimento de oxigênio e aumento da concentração de amônia livre, que está associado com o pH do meio (SCHIMIDELL et al., 2007; BERNET; SPÉRANDIO, 2009). Os efeitos destas variáveis sobre a comunidade bacteriana foram discutidos no item 3.4.1. Hellinga e colaboradores (1998) sugerem que a temperatura seja controlada em aproximadamente 35°C e o pH entre 8,0 e 8,2 para favorecer o *wash-out* das BONs. Para limitar a concentração de oxigênio a estratégia mais empregada e prática é realizar aeração intermitente, ou seja, intercalar períodos aerados com períodos sem aeração (MICHELS, 2016; PERAZOLLI, 2015; BRESSAN, 2012; ZDRADEK, 2005).

Ao trabalhar com a nitrificação parcial deve-se atentar para a elevada sensibilidade das BOAs na presença de compostos tóxicos, pois isto pode levar à inibição do processo. Alguns trabalhos já relataram que a presença de nanomateriais com propriedades antimicrobianas (MICHELS, 2016; PERAZOLLI, 2015) e antibióticos (BRESSAN, 2012; HUGHES, 2013) são capazes de inibir a atividade destas bactérias. Em relação à ação de antibióticos, em especial, as tetraciclinas, há pouca informação a respeito da inibição sobre culturas enriquecidas de BOAs, sendo mais comum estudos sobre culturas nitrificantes (BOA + BON) (CAMPOS et al., 2001; KATIPOGLU-YAZAN et al., 2015; CHEN et al., 2015).

4 METODOLOGIA

A parte experimental foi estruturada como está mostrado na Figura 6. Na primeira etapa foi realizado o cultivo de cada cultura bacteriana em reatores biológicos. Em seguida estas culturas foram utilizadas em ensaios de inibição na presença de cada antibiótico, separadamente e, por fim, foram obtidas a equação de inibição para cada experimento a fim de encontrar os valores correspondentes à concentração de antibiótico que inibe 50% da atividade bacteriana (CI-50).

Figura 6 – Esquema das etapas experimentais executadas neste trabalho.



Fonte: Do autor.

4.1 REATORES BIOLÓGICOS

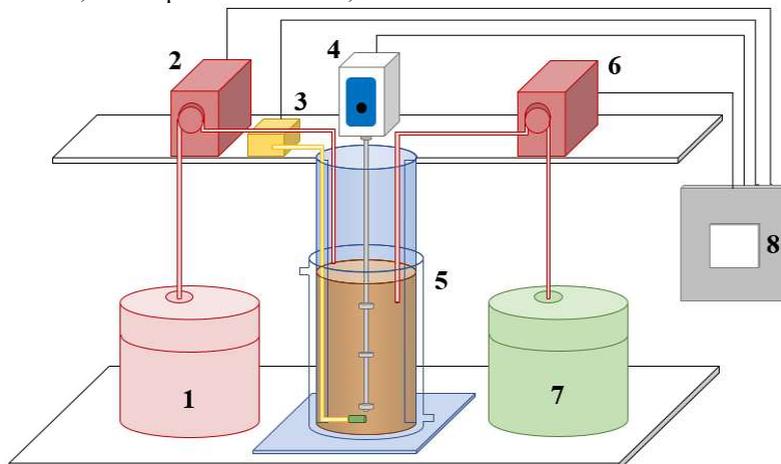
Tendo em vista que o objetivo deste trabalho é avaliar a atividade inibitória de tetraciclina sobre as bactérias que atuam na nitrificação (BOAs e BONs), foram operados dois reatores de batelada sequencial (RBS) para produção de biomassa nitritante e nitrificante. Tais reatores foram denominados reator NP (abreviação para “nitrificação parcial”) e reator NT (abreviação para “nitrificação total”), portanto, o reator NP foi operado a fim de obter biomassa nitritante e o reator NT para obtenção de biomassa nitrificante.

4.1.1 Reator de nitrificação parcial (NP)

Visando o crescimento de biomassa nitritante foi operado um reator RBS cilíndrico, de acrílico e confeccionado no LTBR/UFSC com volume útil de 8,0 L (53,0 cm de altura e 17,7 cm de diâmetro) (Figura 7). A temperatura do reator foi mantida a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ por meio de um sistema de recirculação de água na parte externa. Este sistema foi composto de um banho termostatizado, cujo aquecimento foi promovido por uma resistência (Atman Aquarium Heater, BT-100W) e a recirculação da água mantida por uma motobomba submersa (Sarlo Better®, 520).

A alimentação e o descarte do reator foram realizados com bombas peristálticas (Masterflex®, L/S com cabeçote Easy-load II e Milan, BP-200). A aeração foi em fluxo ascendente utilizando uma bomba compressora de ar (Big Air®, A420) conectada a uma pedra porosa por meio de uma mangueira de silicone. Além disso, foi empregado um agitador de pás (Dist, 930) para manter as células em suspensão e melhorar a transferência de oxigênio. Uma vez que o agitador não possuía display para a indicação da velocidade de rotação, não foi possível afirmar a velocidade exata aplicada ao sistema. A alimentação, o descarte, a aeração e agitação do reator foram automatizados com um controlador lógico programável (CLP) (Dexter, μDX série 100).

Figura 7 – Esquema representativo do reator para obtenção de biomassa nitritante. 1: Recipiente de alimentação; 2: Bomba de alimentação; 3: Aerador; 4: Agitador mecânico; 5: Reator biológico com sistema de aquecimento; 6: Bomba de descarte; 7: Recipiente de descarte; 8: CLP.



Fonte: Do autor.

4.1.1.1 Inóculo

Para inocular o reator NP foi utilizada uma biomassa predominantemente nitrificante que estava aclimatada em um reator RBS de 1,5 L utilizando o mesmo meio de cultura descrito no item 4.1.1.2. Para preparar o inóculo foram retirados 800 mL (10% do volume útil do reator NP) deste reator RBS com uma concentração de células igual a $0,63 \text{ g SST} \cdot \text{L}^{-1}$.

Originalmente essas células foram obtidas a partir do enriquecimento da biomassa de lodos ativados proveniente de uma planta de tratamento de esgotos sanitários (CASAN, Florianópolis/SC).

4.1.1.2 Meio de Cultura

Inicialmente, o reator NP foi alimentado com o meio sintético adaptado por Michels (2016), a partir dos meios propostos por Campos e colaboradores (1999) e Choi e colaboradores (2008). A composição do meio está apresentada nas Tabelas 5 e 6. No entanto, devido ao baixo crescimento celular observado nos primeiros meses de operação, optou-se por aplicar o meio sintético proposto por Campos e colaboradores (1999) com algumas modificações. As adaptações realizadas no meio foram referentes à concentração de nitrogênio, que variou de acordo com a progressão de carga aplicada nos reatores até alcançar $1 \text{ g N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$, e a alcalinidade que foi ajustada para fornecer somente a quantidade estequiométrica necessária para a oxidação da amônia. A composição deste meio utilizada está apresentada nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 5 – Composição do meio de cultura inicial

Nutriente	Concentração ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,4200 – 2,3600
KH_2PO_4	0,2220
$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	0,1347
NaNO_3	1,2927
NaHCO_3	3,5800 – 5,9600
Solução de micronutrientes	$0,4444 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$

Fonte: Michels (2016)

Tabela 6 – Composição da solução de micronutrientes inicial

Nutriente	Concentração (g·L⁻¹)
Ca(NO ₃) ₂	8,1908
FeCl ₂ ·4H ₂ O	3,5684
MnSO ₄ ·H ₂ O	4,3214
((NH ₄) ₆ Mo ₇) ₂₄ ·4H ₂ O	1,1000
CuSO ₄	1,0036
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22,7599
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	1,9693

Fonte: Michels (2016)

Tabela 7 – Composição do meio de cultura

Nutriente	Concentração (g·L⁻¹)
NH ₄ Cl	0,9552 – 1,9104
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,1798 – 2,3596
KH ₂ PO ₄	0,2222
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2239
NaCl	0,8889
NaHCO ₃	5,9633 – 11,9266
Solução de micronutrientes	0,4444 mL·L ⁻¹

Fonte: Adaptado de Campos *et al* (1999)

Tabela 8 – Composição da solução de micronutrientes

Nutriente	Concentração (g·L⁻¹)
EDTA	50,00
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22,00
CaCl ₂ ·2H ₂ O	7,34
MnCl ₂ ·4H ₂ O	5,06
FeSO ₄ ·7H ₂ O	4,99
((NH ₄) ₆ Mo ₇) ₂₄ ·4H ₂ O	1,10
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,57
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,61

Fonte: Vischniak; Santer (1957)

4.1.1.3 Partida e operação do reator

A partida do reator foi baseada na progressão da vazão de alimentação e consequentemente na progressão da carga amoniacal aplicada ao sistema. Para tanto, após a inoculação, foi adicionado o meio de cultura com concentração de amônia igual a 300 mg N-NH₄⁺·L⁻¹ e uma vazão inicial de 0,4 L·dia⁻¹, que era aumentada de acordo com o

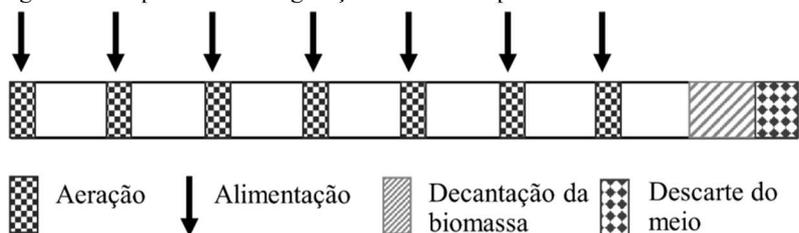
decaimento de amônia dentro do reator. O descarte não foi realizado até que o volume do reator chegasse a 8,0 L.

No 14º dia de operação, quando a vazão era de 0,8 L·dia⁻¹, foi alcançado o volume útil do reator e então a bomba de descarte foi acionada com uma vazão igual à vazão de alimentação. A partir desse dia a progressão de carga foi feita tanto pelo aumento de concentração de substrato no meio quanto pela diminuição do TRH, para aclimatar a biomassa à condição de elevada concentração de amônia encontrada no tratamento de efluentes da suinocultura.

Como mencionado anteriormente, foi utilizado um CLP para controlar os períodos de alimentação, descarte e aeração. Assim, o sistema foi operado em 3 ciclos, cada um com duração de 8 h, das quais 7 h foram destinadas à reação e 1 h para decantação da biomassa (40 min) e descarte (20 min). Durante o período de reação, a cada 1 h, o reator foi aerado por 15 min e deixado em anaerobiose por 45 min (Figura 8). Essa estratégia foi usada para limitar a disponibilidade de oxigênio dissolvido dentro do reator e por consequência inibir o crescimento das BONs, o que reduziu a oxidação de nitrito a nitrato (ZDRADEK, 2005).

Além disso, a alimentação do reator foi distribuída ao longo do ciclo e realizada em conjunto com a aeração (Figura 8). Esse artifício foi empregado por dois motivos: evitar a ausência de amônia ao final do ciclo e reduzir a perda de alcalinidade. A ausência de amônia poderia levar ao aumento da concentração de OD e, se esta fosse mantida assim por um tempo maior que o previsto pela distribuição da aeração, acarretaria no crescimento de BONs dentro do reator. Em relação à alcalinidade, que foi adicionada na forma de bicarbonato de sódio, a sua adição somente no início do ciclo provocaria a *stripping* de CO₂ durante as aerações iniciais, levando à perda de alcalinidade e à uma grande variação do pH dentro do reator (BRESSAN, 2012).

Figura 8 – Esquema da configuração dos ciclos operacionais do reator NP.



Fonte: Do autor.

A idade do lodo não foi controlada durante a operação do reator, havendo remoção de biomassa apenas para realização dos testes cinéticos. As condições operacionais do reator NP estão apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9 – Condições operacionais do reator NP

Parâmetro	Condição empregada
Volume (L)	8,0
Vazão (L·dia ⁻¹)	0,4 – 3,0
TRH (dia)	5,0 – 2,7
Concentração do substrato (mg N-NH ₄ ⁺ ·L ⁻¹)	300,0 – 1.000,0
Carga (mg N-NH ₄ ⁺ ·L ⁻¹ ·dia ⁻¹)	60,0 – 375,0
Agitação	Mecânica
Aeração (min·h ⁻¹ de reação)	15,0

4.1.1.4 Monitoramento do reator NP

O monitoramento do reator foi baseado na quantificação da biomassa, dos íons amônio, nitrito e nitrato e pH. A concentração de biomassa foi determinada mensalmente pelas análises de SST e SSV (item 4.3.4). As análises de concentração de nitrogênio nas formas NH₄⁺, NO₂⁻, NO₃⁻ foram realizadas 3 vezes por semana por meio das metodologias descritas nos itens 4.3.1, 4.3.2 e 4.3.3, respectivamente. A medição do pH foi feita diariamente utilizando um pHmetro portátil (Hanna®, HI 98190) sendo corrigido com soluções de HCl 2,5% p/p ou NaOH 2,5% p/p, quando necessário. A medição do OD foi feita com um oxímetro portátil (WTW®, Oxi 340/SET), de modo intermitente.

4.1.2 Reator de nitrificação total (NT)

O reator NT foi operado visando o crescimento de bactérias nitrificantes (BOA + BON). O sistema operacional deste reator foi similar ao do reator NP, havendo alteração somente no dimensionamento do reator e no sistema de agitação, portanto, também pode ser representado pela Figura 7. Foi utilizado um reator cilíndrico e de acrílico confeccionado no LTBR/UFSC com volume útil de 5,0 L (26,0 cm de altura e 17,7 cm de diâmetro). A temperatura foi mantida a 30 ± 1°C através de um sistema de recirculação de água na parte externa, igual ao utilizado no reator NP contendo uma resistência (Atman Aquarium Heater, BT-100W) e uma motobomba submersa (Sarlo Better®, 520).

A alimentação e o descarte do reator foram realizados com bombas peristálticas (Masterflex®, L/S com cabeçote Easy-load II e

Milan, BP-200). A aeração foi em fluxo ascendente utilizando uma bomba compressora de ar (Big Air®, A420) conectada a uma pedra porosa por meio de uma mangueira de silicone. Além disso, foi empregado um agitador magnético (IKA®, C-MAG HS 7) com velocidade de rotação igual a 200 rpm para manter as células em suspensão. A alimentação, o descarte, a aeração e agitação do reator foram automatizados com o mesmo CLP do reator NP (Dexter, μ DX série 100).

4.1.2.1 Inóculo

O reator NT foi inoculado com biomassa proveniente do reator NP. Apesar deste reator conter principalmente biomassa nitritante, as BONs ainda estão presentes no reator NP, porém com atividade reduzida, e assim as condições empregadas na operação do reator NT são capazes de reestabelecer o crescimento das BONs. Para preparar o inóculo foram retirados 500 mL do reator NP (10% do volume útil do reator NT) que no momento estava com concentração celular igual a $0,77 \text{ g SST} \cdot \text{L}^{-1}$.

4.1.2.2 Meio de cultura

O meio de cultura usado para o crescimento das bactérias no reator NT foi o mesmo usado no reator NP após a mudança para o meio proposto por Campos e colaboradores (1999) com as mesmas modificações. A composição deste meio está apresentada nas Tabelas 7 e 8.

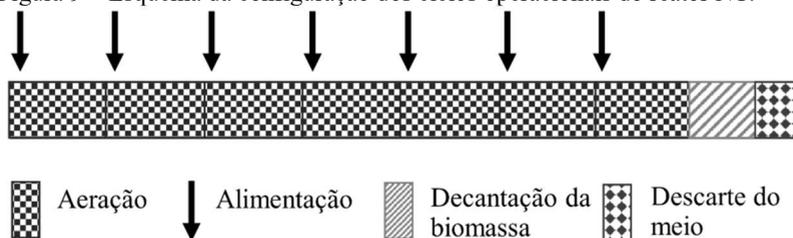
4.1.2.3 Partida e operação do reator

Assim como no reator NP, a partida do reator NT foi baseada na progressão da carga amoniacal aplicada ao sistema. Para tanto, após a inoculação, foi adicionado o meio de cultura com concentração de amônia igual a $500 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ e uma vazão inicial de $0,5 \text{ L} \cdot \text{dia}^{-1}$, que foi aumentada de acordo com o decaimento de amônia dentro do reator. O descarte não foi realizado até que o volume do reator chegasse a 5,0 L.

No 6º dia de operação, quando a vazão era de $1,0 \text{ L} \cdot \text{dia}^{-1}$, foi alcançado o volume útil do reator e então a bomba de descarte foi acionada. A partir desse dia a progressão de carga foi feita tanto pelo aumento de concentração de substrato no meio quanto pela diminuição do TRH para aclimatar a biomassa à elevada concentração de amônia característica dos efluentes da suinocultura.

Por utilizar o mesmo CLP empregado no reator NP, o sistema foi operado em 3 ciclos, cada um com duração de 8 h, sendo 7 h de reação e 1 h para decantação da biomassa (40 min) e descarte (20 min). A principal diferença entre os dois reatores foi o emprego de aeração contínua durante o período de reação no reator NT (Figura 9). Esse artifício foi empregado para garantir o fornecimento de oxigênio necessário para promover o crescimento das BONs. A alimentação também foi distribuída ao longo do ciclo, de modo que, durante 1h de reação o reator era alimentado por 15 min a fim de reduzir a perda de alcalinidade ao longo do ciclo (BRESSAN, 2012).

Figura 9 – Esquema da configuração dos ciclos operacionais do reator NT.



Fonte: Do autor.

A idade do lodo não foi controlada durante a operação do reator, havendo remoção de biomassa para realização dos testes cinéticos ou para manutenção da nitrificação completa. As condições operacionais do reator NT estão apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10 – Condições operacionais do reator NT

Parâmetro	Condição empregada
Volume (L)	5,0
Vazão (L·dia ⁻¹)	0,5 – 4,0
TRH (dia)	5,0 – 1,0
Concentração do substrato (mg N-NH ₄ ⁺ ·L ⁻¹)	500,0 – 1.000,0
Carga (mg N-NH ₄ ⁺ ·L ⁻¹ ·dia ⁻¹)	100,0 – 800,0
Agitação	Magnética
Aeração	Contínua

4.1.2.4 Monitoramento do reator

O reator NT foi monitorado em relação às mesmas variáveis do reator NP, a saber: concentração de biomassa, dos íons amônio, nitrito e nitrato, OD e pH. A concentração de biomassa era determinada

mensalmente pelas análises de SST e SSV (item 4.3.4). As análises de concentração de nitrogênio nas formas NH_4^+ e NO_3^- foram realizadas 3 vezes por semana por meio das metodologias descritas nos itens 4.3.1 e 4.3.3, respectivamente, já o NO_2^- foi medido uma vez por semana, salvo quando havia aumento do mesmo no reator. A medição de pH foi feita diariamente utilizando um pHmetro portátil (Hanna®, HI 98190) sendo corrigido com soluções de HCl 2,5% p/p ou NaOH 2,5% p/p, quando necessário. O OD também foi medido diariamente utilizando um oxímetro portátil (WTW®, Oxi 340/SET).

4.2 ENSAIOS DE INIBIÇÃO EM BATELADA SOBRE AS CULTURAS BACTERIANAS

Para realizar os ensaios de inibição optou-se por trabalhar com a tetraciclina ($\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8$) e a oxitetraciclina ($\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_9$), que são os antibióticos do grupo das tetraciclinas mais consumidos para o uso veterinário (DAGHRIR; DROGUI, 2013) e por serem encontrados nos efluentes em concentrações elevadas quando comparados aos demais compostos deste grupo (Tabela 4). Estes ensaios foram realizados a fim de identificar os efeitos de curta exposição destes dois antibióticos sobre culturas nitritantes e nitrificantes, bem como a concentração capaz de inibir a atividade destas bactérias em 50% (CI-50).

A tetraciclina e a oxitetraciclina utilizadas neste experimento foram adquiridas pela Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemanha) na forma de hidrocloreto, $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot \text{HCl}$ e $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_9 \cdot \text{HCl}$, respectivamente, com qualidade HPLC (grau de pureza maior ou igual a 95%).

Os ensaios foram realizados em erlenmeyers aletados com volume de reação de 200 mL. A estes foram adicionadas diferentes concentrações dos antibióticos (Tabelas 11 e 12) e mantidos sob agitação a 200 rpm por 12 horas em shaker orbital (Tecnal®, TE-420). Cada erlenmayer foi inoculado com $0,5 \text{ g SSV} \cdot \text{L}^{-1}$ de biomassa nitritante ou nitrificante utilizando o mesmo meio de cultivo dos reatores, cuja única alteração foi a concentração de amônia, que foi reduzida para $200 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$, assim como a concentração de bicarbonato que foi reduzida proporcionalmente. O tempo de duração da cinética e a concentração de N-NH_4^+ foram estabelecidos com base em ensaios prévios. O pH foi ajustado para 7,5. A temperatura foi mantida de acordo com a que foi estabelecida para o crescimento das células, ou seja, $32 \pm 1^\circ\text{C}$ nos ensaios com biomassa nitritante e $30 \pm 1^\circ\text{C}$ nos ensaios com biomassa nitrificante.

Tabela 11 – Concentração de antibiótico utilizada nos ensaios com biomassa nitrificante.

Ensaio	Tetraciclina (mg·L ⁻¹)	Oxitetraciclina (mg·L ⁻¹)
0	0	0
1	3	10
2	30	50
3	100	300
4	200	600
5	300	1200
6	400	1400
7	500	-

Tabela 12 – Concentração de antibiótico utilizada nos ensaios com biomassa nitrificante.

Ensaio	Tetraciclina (mg·L ⁻¹)	Oxitetraciclina (mg·L ⁻¹)
0	0	0
1	100	100
2	250	500
3	500	1000
4	750	1500
5	1000	2000

Para o estudo cinético foram retiradas alíquotas de 6 mL a cada 2 horas a fim de acompanhar o consumo de amônia, assim como a produção de nitrito e nitrato. Primeiramente, as amostras foram submetidas a centrifugação por 10 min a 10.000 g (Centrífuga Eppendorf, 5804R) para sedimentação da biomassa suspensa. Em seguida, foi feita a extração dos antibióticos utilizando um sistema para extração em fase sólida com cartuxos HLB® 3 cc (Oasis, Waters) para não haver interferência nas análises devido à coloração da solução com o antibiótico. As análises para determinação da amônia, nitrito e nitrato estão descritas nos itens 4.3.1, 4.3.2 e 4.3.3. Ao final dos ensaios foram retiradas alíquotas de 10 mL para realizar o estudo da morfologia em microscópio eletrônico de varredura (MEV), cuja metodologia está descrita no item 4.2.2.

4.2.1 Cálculo da inibição

A inibição sofrida pelas culturas de bactérias na presença dos antibióticos foi calculada com base no consumo de amônia e seu cálculo está descrito na Equação 6:

$$I = \left(\frac{r_{\text{N-NH}_4^+,0} - r_{\text{N-NH}_4^+,i}}{r_{\text{N-NH}_4^+,0}} \right) \cdot 100\% \quad (6)$$

Na qual,

I é a inibição em porcentagem;

$r_{\text{N-NH}_4^+,0}$ é a velocidade máxima de consumo de amônia do ensaio de controle (sem adição de antibiótico) ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$);

$r_{\text{N-NH}_4^+,i}$ é a velocidade máxima de consumo de amônia do ensaio contendo o antibiótico ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

As velocidades de consumo de amônia foram obtidas a partir dos dados experimentais ajustados pelo método de mínimos quadrados ponderados. Esse método se aplica a conjuntos de dados com variância heterogênea e permite melhor ajuste dos dados. A velocidade de consumo de amônia foi calculada a partir da tangente da reta entre dois pontos consecutivos, como mostra a Equação 7:

$$r_{\text{N-NH}_4^+} = \frac{[\text{N-NH}_4^+]_{t_{j-1}} - [\text{N-NH}_4^+]_{t_j}}{\Delta t} \quad (7)$$

Na qual,

$[\text{N-NH}_4^+]_{t_{j-1}}$ é a concentração de amônia do ensaio no tempo $t = t_{j-1}$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$);

$[\text{N-NH}_4^+]_{t_j}$ é a concentração de amônia do ensaio no tempo $t = t_j$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$);

Δt é o intervalo de tempo $t_j - t_{j-1}$ (h).

Por fim, a velocidade de máxima de consumo é aquela referente à tangente de maior inclinação, ou seja, com maior consumo de amônia.

4.2.2 Microscopia eletrônica de varredura

A análises micrográficas foram realizadas no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6390LV pertencente ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina.

As amostras foram preparadas a partir de uma adaptação da metodologia descrita por Ferreti (2009), inicialmente proposta por Nation

(1983) e adaptada por Varesche e colaboradores (1997). Primeiramente as amostras de 10 mL foram centrifugadas a 7.500 rpm por 15 min a fim de obter um *pellet* homogêneo. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e adicionada uma solução de tampão fosfato 0,1 M pH 7,3 e glutaraldeído (97,5:2,5 v/v) em volume entre 5 a 8 vezes superior ao volume do *pellet*. As amostras foram acondicionadas a 4,0°C por 12 horas, para ocorrer a fixação das células. Após esse período iniciou a lavagem das células com tampão fosfato 0,1 M pH 7,3. O volume de solução também foi entre 5 e 8 vezes superior ao volume do *pellet*. As amostras foram deixadas em contato com a solução por 30 min e o procedimento foi repetido 3 vezes. A desidratação ocorreu logo em seguida com adição gradual de etanol 50, 70, 80, 90 e 95%, cada uma por 10 min. Em seguida foi adicionado etanol 100%, que foi repetido 3 vezes.

No LCME foi realizada a segunda fixação das células, agora em fita de carbono dupla face com adição de hexametildisilazano (HMDS) sobre a amostra fixada. Então procedeu-se a secagem a 30°C por 2h seguida pelo recobrimento das amostras com ouro para análise no microscópio.

4.2.3 Interferência da composição do meio sobre a tetraciclina

Sabe-se que a tetraciclina é um composto de baixa estabilidade e que as condições empregadas nos ensaios cinéticos como o pH e a temperatura podem influenciar na sua degradação. Assim, com o intuito de investigar se algum dos componentes do meio ou das condições do processo poderiam provocar alterações na tetraciclina foram preparadas diferentes soluções contendo o antibiótico e o meio de cultura usado nos experimentos. A composição de cada solução está descrita na Tabela 13. As soluções foram mantidas a 30°C por 8 h. Em seguida foi feita a varredura das amostras de 190 a 780 nm em espectrofotômetro (HACH, DR 5000).

Tabela 13 – Composição das soluções. TC: tetraciclina.

Solução	TC (mg·L ⁻¹)	Meio	N-NH ₄ ⁺ (mg·L ⁻¹)	NaHCO ₃ (g·L ⁻¹)	pH
1	300	Não	0	0,00	2,8
2	300	Sim	200	0,00	3,3
3	300	Sim	100	1,20	-
4	300	Sim	200	0,00	7,6*
5	300	Sim	200	2,39	7,5

*pH corrigido com KOH.

4.3 DETERMINAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS

4.3.1 Determinação de nitrogênio amoniacal

A determinação de nitrogênio amoniacal (N-NH_4^+) foi realizada de acordo com o método proposto por Nessler e descrito por Vogel (2002). O reagente de Nessler é uma solução alcalina de tetraiodo-mercurato (II) de potássio. É preparada a partir da dissolução de 100 g de iodeto de mercúrio (II) e 70 g de iodeto de potássio em 100 mL de água, que em seguida é adicionada à 700 mL de uma solução contendo 160 g de hidróxido de sódio e então avolumada para 1.000 mL. Quando uma solução contendo amônia reage com o reagente de Nessler forma um composto de coloração laranja-amarronzada (Equação 8), que pode ser quantificado por espectrofotometria a um comprimento de onda de 525 nm. A faixa de trabalho desta análise varia de 1 a 20 mg $\text{N-NH}_4^+\cdot\text{L}^{-1}$.



Para a análise, foram utilizados 5 mL de amostra previamente diluída aos quais foram adicionados 100 μL do reagente de Nessler. Esperou-se 10 min e então foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro (HACH, DR 5000).

4.3.2 Determinação de nitrito

Para determinar a fração de nitrogênio presente na forma de nitrito (N-NO_2^-) foi usado o kit comercial NitriVer 2 (HACH). Esta análise está identificada no catálogo do fabricante como método 8153. Ela está baseada na redução de nitrito a óxido nitroso na presença de sulfato ferroso em um meio ácido. Quando os íons de ferro são combinados com o óxido nitroso é formado um complexo marrom-esverdeado que é diretamente proporcional à concentração de nitrito na amostra e cuja absorbância pode ser medida em espectrofotômetro a 585 nm. A faixa de trabalho deste método é de 0 a 250 mg $\text{N-NO}_2^-\cdot\text{L}^{-1}$.

Para realização da análise foram seguidas as recomendações do fabricante. Primeiramente foram adicionados 10 mL de amostra a um tubo com tampa de rosca e então foi adicionado todo o conteúdo de um pacote de NitriVer 2. O tubo foi fechado e agitado vigorosamente até que todo o reagente estivesse diluído, então esperou-se 10 min para realizar a leitura da absorbância em espectrofotômetro (HACH, DR 5000).

4.3.3 Determinação de nitrato

A fração de nitrogênio presente na forma de nitrato (N-NO_3^-) foi determinada de acordo com o método descrito por Cataldo e colaboradores (1975). Este método está baseado na complexação do ácido salicílico pelo íon nitrato em meio ácido, que forma uma coloração amarelada ao aumentar o pH para 12,0. Essa coloração é proporcional à quantidade de nitrato presente na amostra, podendo ser medida em espectrofotômetro a 410 nm. Esse método possui uma faixa de trabalho de 1 a 70 $\text{mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$.

Para a análise, foi adicionado 0,2 mL de amostra em um tubo de ensaio e então acrescentado 0,8 mL de uma solução de ácido salicílico em ácido sulfúrico a 5% (p/v). Esperou-se 20 min para completar a reação e então foram adicionados 19 mL de NaOH 2N. Após as amostras esfriarem até a temperatura ambiente foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro (HACH, DR 5000).

4.3.4 Determinação dos sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos voláteis (SSV) e sólidos suspensos fixos (SSF)

A concentração de células foi medida em relação à concentração de sólidos nos reatores. Primeiramente foi quantificada a concentração de SST conforme o método gravimétrico descrito por Zdradek e colaboradores (2006). Foram coletados 20 mL de amostra dos reatores que foi filtrada em membrana de acetato de celulose com poro de 0,45 μm previamente seca em micro-ondas a 180 watts por 15 min e pesada. Após a filtração a membrana, agora com a biomassa, foi submetida à secagem sob as mesmas condições, resfriada em dessecador e pesada. A concentração de SST foi determinada pela diferença de peso da membrana antes e depois da filtração.

As análises de SSV e SSF foram realizadas utilizando as amostras provenientes da análise de SST conforme descrito em *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005). As amostras foram colocadas em cadinhos previamente calcinados em mufla a 550 °C por 30 min, resfriados em dessecador e pesados. Em seguida as amostras foram calcinadas sob as condições já descritas e o processo foi repetido até obter peso constante. A concentração de SSF foi determinada por gravimetria, já o SSV foi determinado pela diferença entre SST e SSF.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTABELECIMENTO E MONITORAMENTO DOS REATORES PARA CRESCIMENTO DE BIOMASSA

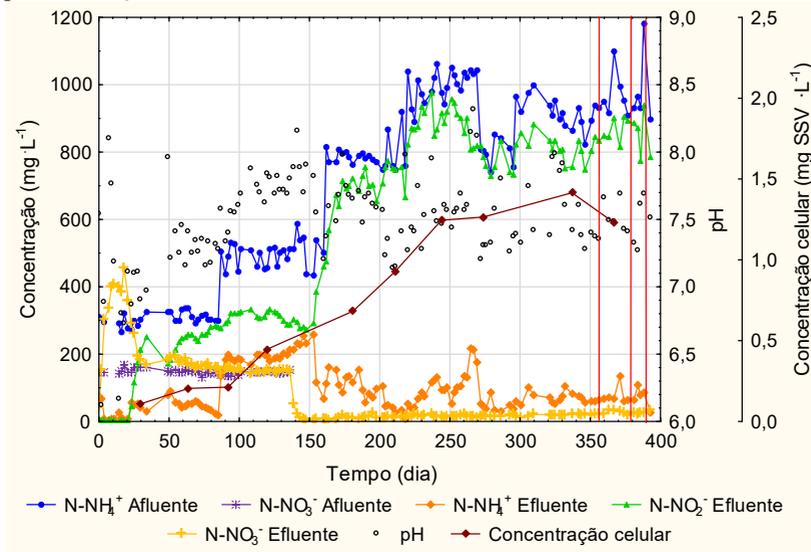
5.1.1 Reator de nitrificação parcial (NP)

O reator de nitrificação parcial foi operado durante 393 dias com progressão de carga iniciando em 60 até 375 mg·L⁻¹·dia⁻¹. Durante este período foi possível observar que as estratégias adotadas para o estabelecimento e a manutenção de uma biomassa nitritante foram eficientes, de modo que a partir do 23° dia de operação já foi possível observar acúmulo de nitrito no reator, o qual se manteve até o final. Até o 136° dia de operação do reator foi observado um crescimento celular muito baixo. A concentração de células durante este período variou de 0,1100 g SSV·L⁻¹ no 30° dia até 0,3425 g SSV·L⁻¹ no 120°, razão pela qual optou-se por modificar o meio de cultura no 136° dia, tendo em vista que o principal objetivo operacional deste reator era a obtenção de biomassa. A partir de então, houve crescimento considerável de células, alcançando a concentração máxima de 1,4150 g SSV·L⁻¹ no 337° dia. A Figura 10 mostra a variação de algumas das variáveis do processo durante o período de operação do reator NP.

A definição dos períodos aeróbios e anaeróbios em 15 e 45 min (item 4.1.1.3, p. 62), respectivamente, foi capaz de limitar a disponibilidade de oxigênio dentro do reator ao longo do ciclo. Durante a aeração foram registrados valores de OD entre 1,5 e 2,9 mg·L⁻¹ que eram reduzidos para, em média, 0,8 mg·L⁻¹ logo nos primeiros minutos após a interrupção da aeração, indicando o início da fase anóxica.

A distribuição da alimentação ao longo do ciclo também alcançou o resultado esperado. Não foram observadas variações bruscas no pH durante a operação do reator, sendo mantido, em grande parte do tempo, entre 7,2 e 8,0. Apesar de ser recomendado que se trabalhe com pH superior a 8,0 para estabelecimento de uma cultura nitritante (HELLINGA et al., 1998), os valores de pH inferiores a 7,5, principalmente após o 200° dia de operação, não interferiram negativamente no processo e a concentração de nitrato manteve-se próxima de zero (Figura 10). A amônia esteve presente em baixas concentrações ao final dos ciclos operacionais, porém, mesmo assim, a atividade das BONs no reator manteve-se baixa. Estes resultados indicam que os principais fatores responsáveis pela limitação do crescimento de bactérias nitratantes foram a aeração intermitente e a temperatura.

Figura 10 – Concentração das formas nitrogenadas e pH durante o período de operação do reator NP. As linhas vermelhas indicam os dias de retirada de células para realização dos ensaios cinéticos.



Fonte: Do autor.

É possível observar que o reator alcançou boa eficiência de conversão de amônia, superior a 85%, em mais da metade do tempo de operação do reator. No entanto, foram verificados períodos com queda significativa da eficiência de conversão da amônia. Entre os dias 143 e 153 a eficiência foi reduzida a 40% devido ao baixo fornecimento de oxigênio durante a aeração provocado pelo entupimento da pedra porosa. Após o aumento da concentração de alimentação de nitrogênio amoniacal para 1.000 mg N-NH₄⁺·L⁻¹, foi verificado um constante aumento na concentração de amônia no efluente do reator entre os dias 255 e 267 e optou-se por reduzir a concentração da alimentação para 750 mg N-NH₄⁺·L⁻¹.

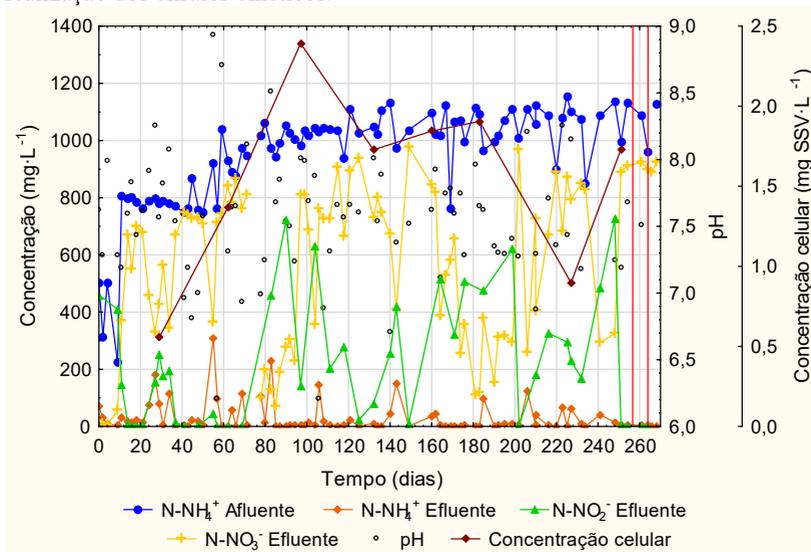
Analisando todo o período operacional do reator NP é possível dizer que a biomassa nitritante é estável e adaptada a cargas elevadas de nitrogênio amoniacal (337,5 mg N-NH₄⁺·L⁻¹·dia⁻¹). De acordo com Bressan (2012), um processo estável resulta em maior diversidade biológica e estabilidade em relação à composição das espécies, fatores que são favoráveis para a realização de ensaios cinéticos de atividade.

5.1.2 Reator de nitrificação total (NT)

O reator de nitrificação total foi operado durante 268 dias com progressão de carga de 100 até 800 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$. De modo geral foi possível obter uma cultura de bactérias enriquecida em biomassa nitrificante (BOA+BON) com boa eficiência de conversão de nitrogênio amoniacal. O principal desafio para manutenção da biomassa nitrificante foi o crescimento excessivo de biomassa (máximo de 2,39 $\text{g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$) que provocava o entupimento das pedras porosas e consequentemente restringia o fornecimento de oxigênio no reator, que caía de valores entre 4 e 5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Com a finalidade de reduzir este comportamento, constantemente era feita a remoção de 100 a 250 mL de meio homogêneo do reator e feita a limpeza das pedras porosas, ocorrendo a troca das mesmas sempre que necessário. Uma vez que o fornecimento da aeração era estabilizado, o reestabelecimento das BONs era alcançado em poucos dias. O período crítico de operação foi entre os dias 164 e 195, quando houve uma avaria no espectrofotômetro do laboratório o que impossibilitou a leitura em tempo real das concentrações das formas nitrogenadas no reator NT. Durante este período, mesmo com medição diária de pH e OD, ocorreu acúmulo de nitrito no reator, condição que se prolongou por alguns dias. Então, no 227º dia optou-se por remover grande parte das células presentes no reator (aproximadamente 3 L de meio), trocar mais uma vez as pedras porosas e reduzir a carga aplicada ao reator de 600,2 para 400,0 $\text{mg N-NH}_4^+\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$. Após 27 dias verificou-se que a conversão completa de nitrito a nitrato, condição que foi mantida até o desligamento do reator. A Figura 11 mostra a variação de algumas das variáveis do processo durante o período de operação do reator NT.

Apesar dos problemas relacionados à conversão de nitrito a nitrato, o processo apresentou elevada eficiência de conversão de amônia. Durante os dias 251 e 268 (período de estabilidade quando foram realizados os ensaios cinéticos) foi alcançada uma conversão média de 86,04% de nitrogênio amoniacal em nitrato, indicando que a microbiota utilizada nos experimentos estava em regime estável e adaptada às altas concentrações de nitrogênio amoniacal aplicadas na alimentação.

Figura 11 – Concentração das formas nitrogenadas durante o período de operação do reator NT. As linhas vermelhas indicam os dias de retirada de células para realização dos ensaios cinéticos.



Fonte: Do autor.

5.2 EFEITO DOS ANTIBIÓTICOS SOBRE A ATIVIDADE DAS CULTURAS BACTERIANAS

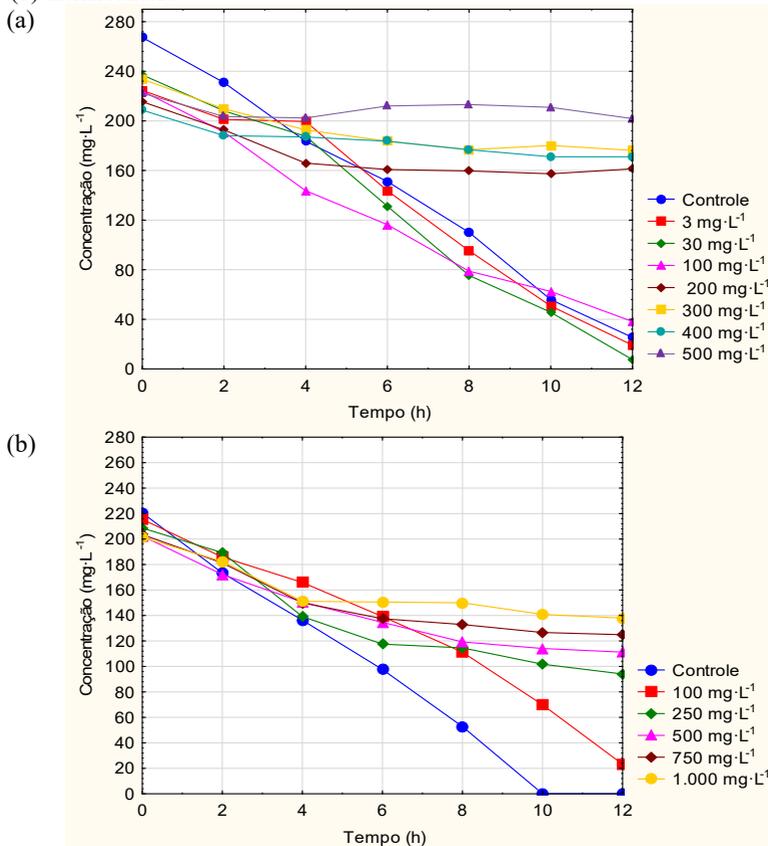
5.2.1 Efeito da tetraciclina sobre as culturas bacterianas

Para estes testes, as amostras de biomassa nitritante, retirada do reator NP, e nitrificante, do reator NT, foram expostas, separadamente, a diferentes concentrações de tetraciclina por 12 h. Os resultados dos ensaios cinéticos encontram-se nos Apêndices A e B. A Figura 12 mostra o perfil de consumo de nitrogênio amoniacal para diferentes concentrações de tetraciclina testadas em cada comunidade bacteriana.

De acordo com os resultados obtidos (Figura 12), é evidente que ambas culturas são afetadas pelo antibiótico, pois há redução significativa do consumo de amônia com o aumento da concentração de tetraciclina. No entanto, é possível perceber que essas culturas são afetadas em níveis distintos. Quando a biomassa nitritante foi exposta a 500 mg·L⁻¹ do antibiótico a conversão de nitrogênio amoniacal, que era de 90% na amostra controle (sem tetraciclina), foi reduzida para 9%. Já no ensaio utilizando a biomassa nitrificante com a mesma concentração de

antibiótico a conversão foi de 45%, enquanto no controle houve consumo total de amônia em um tempo inferior a 12 h.

Figura 12 – Concentração de nitrogênio na forma de amônio (N-NH_4^+) em função do tempo para distintas concentrações de tetraciclina em bactérias (a) nitritantes e (b) nitrificantes.

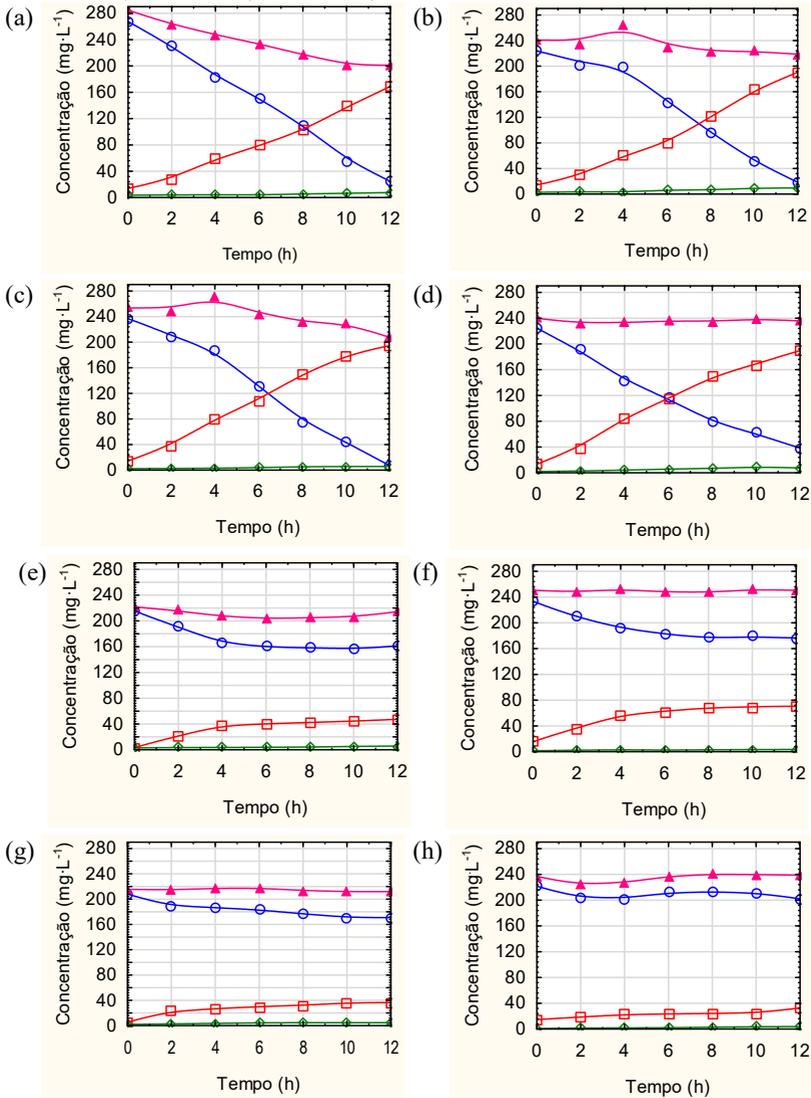


Fonte: Do autor.

Ao final do experimento realizado com as bactérias nitrificantes, como era esperado, não houve produção expressiva de nitrato em nenhum dos ensaios, o que comprova, mais uma vez, que a cultura obtida no reator NP era enriquecida em BOAs (Figura 13).

Figura 13 – Concentração ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) das formas nitrogenadas em função do tempo (h) nos ensaios cinéticos de exposição das bactérias nitríticas à tetraciclina ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$): (a) 0; (b) 3; (c) 30; (d) 100; (e) 200; (f) 300; (g) 400 e (h) 500.

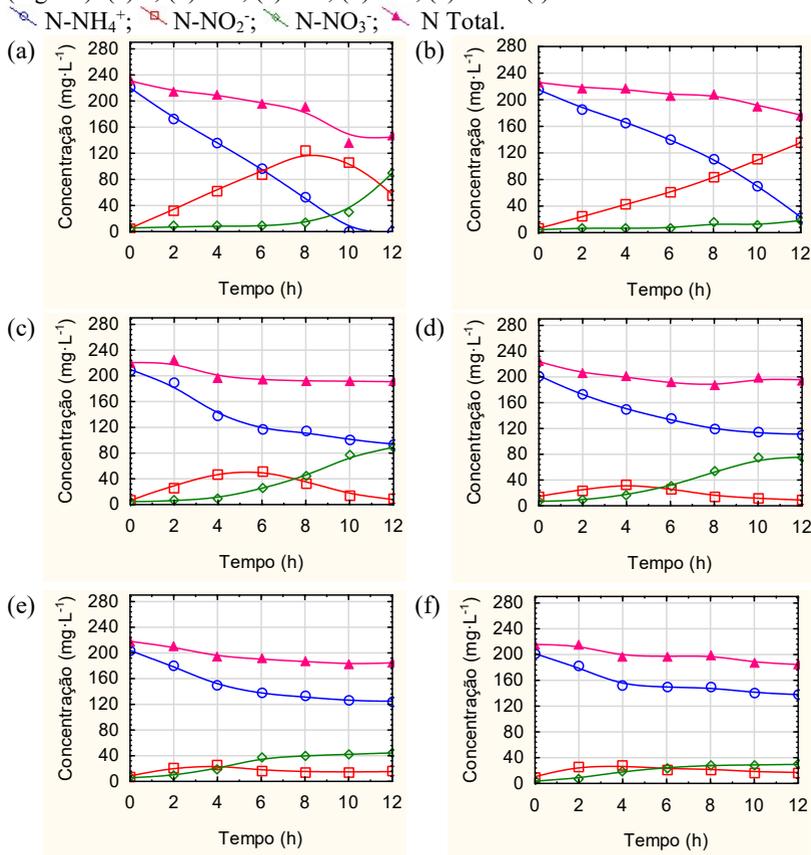
○ N-NH_4^+ ; □ N-NO_2^- ; ▲ N-NO_3^- ; ◆ N Total.



Fonte: Do autor.

Para a cultura nitrificante (Figura 14), os perfis de concentração das formas nitrogenadas nitrito e nitrato foram bem distintos entre si. Em todos os ensaios, com exceção do que foi realizado com $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de tetraciclina, foi observado um nítido acúmulo de nitrito com posterior formação de nitrato, e inclusive nos ensaios com elevadas concentrações de antibiótico, foi possível observar que todo o nitrito produzido foi consumido pelas BONS, o que é um indicativo da menor sensibilidade destas bactérias à tetraciclina. O fenômeno observado no ensaio com $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de antibiótico, no qual a concentração final de nitrito foi a maior obtida nos ensaios ($135 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) enquanto a de nitrato foi $19 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, pode ser melhor compreendido quando são analisadas as velocidades de consumo de amônia ao longo do tempo. Em todos os ensaios observou-se que enquanto a velocidade de consumo de amônia aumentava ou estava próxima a $20 \text{ mg N-NH}_4^+\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ a produção de nitrato era quase imperceptível. Porém, à medida que essa diminuía, a produção de nitrato aumentava alcançando suas velocidades máximas de formação. Outra hipótese para justificar esse comportamento seria a inibição das BONS pelo nitrito; nos demais ensaios, o consumo do nitrito pelas BONS não permitiu seu acúmulo durante o experimento. Assim, a baixa produção de nitrato observada nesse ensaio não seria considerada uma inibição das BONS pela tetraciclina, mas sim uma consequência da velocidade de consumo de amônia ou da concentração de nitrito que estavam altas ao final das 12 h.

Figura 14 – Concentração ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) das formas nitrogenadas em função do tempo (h) nos ensaios cinéticos de exposição das bactérias nitrificantes à tetraciclina ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$): (a) 0; (b) 100; (c) 250; (d) 500; (e) 750 e (f) 1.000.



Fonte: Do autor.

O cálculo da inibição e consequente identificação do CI-50, concentração de antibiótico que inibe a atividade bacteriana em 50%, foi baseado nas velocidades de consumo de amônia em virtude da formação de diferentes produtos nos experimentos e da velocidade de produção de nitrato aparentemente depender da velocidade de consumo de amônia. Além disso, uma vez que o pH durante os ensaios estava constantemente menor que 8, o risco de arraste de amônia durante a aeração pode ser desconsiderado (BRESSAN, 2012; MICHELS, 2016). Os percentuais de

inibição para os experimentos com biomassa nitritante e nitrificantes estão apresentados nas Tabelas 14 e 15, respectivamente.

Tabela 14 – Velocidades máximas de consumo de amônia e percentuais de inibição de diferentes concentrações de tetraciclina sobre bactérias nitritantes.

TC (mg·L ⁻¹)	Log TC	Velocidade máxima (mg N-NH ₄ ⁺ ·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	Inibição (%)
0	-	23,61	0,00
3	0,48	24,31	-2,95
30	1,48	25,61	-8,47
100	2,00	20,26	14,21
200	2,30	11,07	45,52
300	2,48	11,87	49,75
400	2,60	6,98	64,71
500	2,70	7,52	68,13

TC: tetraciclina

Tabela 15 – Velocidades máximas de consumo de amônia e percentuais de inibição de diferentes concentrações de tetraciclina sobre bactérias nitrificantes.

TC (mg·L ⁻¹)	Log TC	Velocidade máxima (mg N-NH ₄ ⁺ ·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	Inibição (%)
0	-	22,83	0,00
100	2,00	22,93	-0,43
250	2,40	19,44	14,86
500	2,70	13,95	38,87
750	2,88	13,04	42,86
1.000	3,00	11,38	50,17

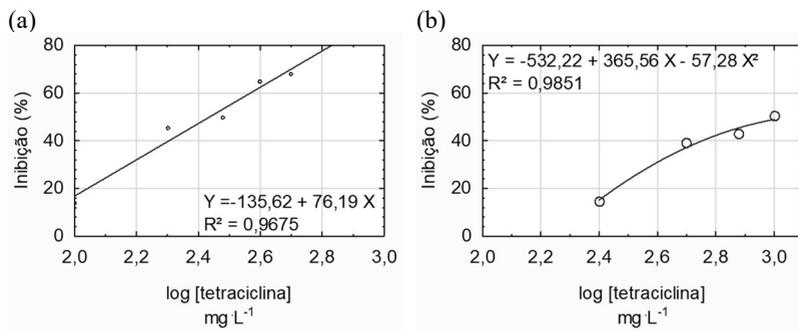
TC: tetraciclina

Foi observado que o aumento da concentração de tetraciclina provoca o aumento da inibição sobre a atividade das duas comunidades, exceto em concentrações menores (3 e 30 mg·L⁻¹ para bactérias nitritantes e 100 mg·L⁻¹ para as nitrificantes), quando o que ocorre, na verdade, é um estímulo da atividade bacteriana. Este efeito, conhecido como hormese, é característico a vários antibióticos que apresentam uma relação dose-resposta bifásica, na qual efeitos estimulatórios são observados em baixas concentrações enquanto altas concentrações levam a um efeito inibitório (MERLIN; LOUVET; POTIER, 2014). De fato, este efeito já foi reportado tanto para a tetraciclina, quanto para microrganismos nitrificantes expostos a outros antibióticos. Migliore, Rotini e Thaller (2013) avaliaram o efeito de baixas concentrações de tetraciclina em

cepas de *Escherichia coli*. Foram aplicadas concentrações entre 0,12 e 0,00375 mg·L⁻¹ por 5 horas e constatou-se que nessas condições o antibiótico estimulou o crescimento celular superando em até 47% o crescimento observado no controle. No estudo conduzido por Cui e colaboradores (2014), uma cultura nitrificante do solo foi exposta a diferentes concentrações de ciprofloxacina durante 40 dias e, na presença de 1 mg·kg⁻¹, a taxa de nitrificação foi estimulada a partir do 3º dia de ensaio.

As concentrações de antibiótico que resultaram em estímulo da atividade não foram utilizadas para a modelagem dos dados. Além disso, foi aplicada a escala logarítmica da concentração de tetraciclina, pois frequentemente a faixa de concentração inibitória dos antibióticos apresenta uma correlação linear entre o percentual de inibição e o logaritmo da concentração (RAUTENBACH et al., 2006). No entanto, o polinômio de segundo grau foi o que melhor descreveu os resultados experimentais de inibição para as bactérias nitrificantes (Figura 15).

Figura 15 – Correlação entre o grau de inibição da atividade bacteriana e o logaritmo da concentração de tetraciclina em comunidades (a) nitritantes e (b) nitrificantes.



Fonte: Do autor.

Pela equação indicada na Figura 15(a) foi encontrado um CI-50 de 273,07 mg·L⁻¹ de tetraciclina para as bactérias nitritantes. Já a equação de ajuste indicada na Figura 15(b) não permite obter um CI-50 da tetraciclina sobre as bactérias nitrificantes, uma vez que não é possível prever a concentração inibitória fora da faixa analisada. No entanto, para termos de comparação, a concentração referente ao CI-50 sobre as nitritantes provocou uma inibição sobre a atividade nitrificante de 18,4%. Estes resultados permitem inferir que a cultura nitrificante é mais resistente à presença da tetraciclina que a nitritante. Uma das justificativas

para este comportamento é a maior diversidade bacteriana devido à presença de BOAs e BONs na comunidade nitrificante. A maior complexidade desta biomassa pode mascarar os efeitos inibitórios sobre os microrganismos mais sensíveis devido à presença de espécies mais resistentes ao antibiótico (KÜMMERER, 2009a). Esse comportamento foi observado por Matos e colaboradores (2014) ao expor uma comunidade nitrificante à presença de $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de tetraciclina por 60 dias. Apesar de não identificar inibição da nitrificação, a composição da comunidade bacteriana foi alterada, havendo redução do gênero *Nitrosomonas* enquanto as *Nitrobacter* não sofreram modificação.

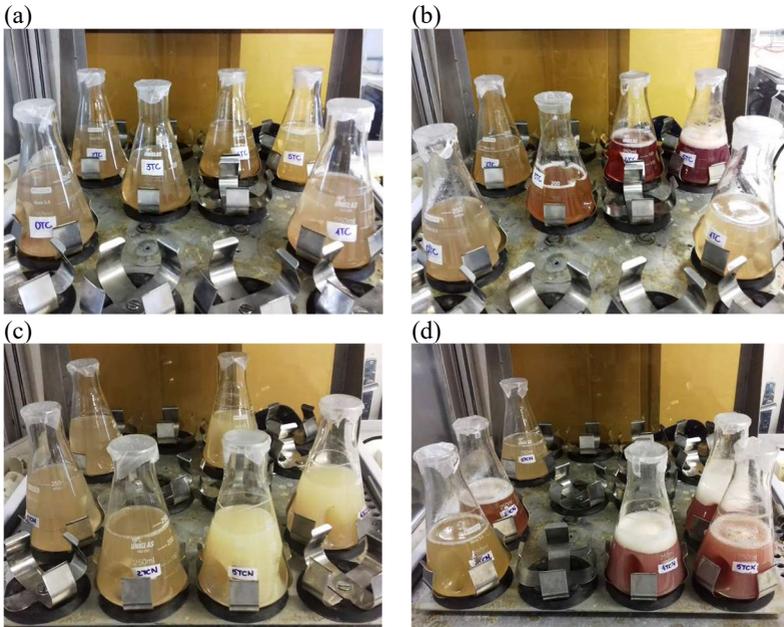
Na literatura existem alguns trabalhos que abordam sobre os efeitos inibitórios da tetraciclina em culturas nitrificantes, no entanto há bastante divergência sobre os resultados obtidos. Fatores como a composição da biomassa, metodologia empregada e o tempo de exposição ao antibiótico dificultam a comparação de resultados pois exercem influência direta sobre a resposta inibitória e podem ser os responsáveis pela variabilidade dos resultados obtidos. Halling-Sørensen (2001) avaliou a inibição da tetraciclina sobre uma cultura pura de *N. europaea* e obteve um CI-50 de $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ em um ensaio com duração de 3 dias. Chen e colaboradores (2015) avaliaram o efeito da tetraciclina sobre a remoção de nitrogênio em uma amostra de lodo ativado, no entanto não observaram nenhum efeito sobre a nitrificação para a faixa de concentração de antibiótico estudada ($0,2$ até $5,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). No estudo realizado por Katipoglu-Yazan e colaboradores (2015) uma cultura enriquecida em bactérias nitrificantes foi exposta a $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de tetraciclina, concentração que não causou nenhuma inibição durante as primeiras 24 h de experimento, porém, após 40 dias levou ao colapso do reator.

5.2.1.1 Interferência da composição do meio sobre a tetraciclina

Durante os experimentos com as duas comunidades bacterianas foi observada uma variação expressiva na coloração do meio (Figura 16). Os ensaios que continham o antibiótico em concentrações mais elevadas apresentavam inicialmente uma coloração amarela, cor característica à tetraciclina. No entanto, ao longo da cinética houve uma mudança gradual do amarelo para o rosa e vinho. Também foi observado que a partir do momento que a coloração rosa predominava, o consumo de amônia sofria uma redução significativa, a concentração de nitrogênio amoniacal se mantinha praticamente constante e o pH do meio aumentava, alcançando

valores entre 7,8 e 8,1. Essas modificações são indícios da degradação da tetraciclina, no entanto, não foi encontrado na literatura nenhum derivado específico que apresente esta tonalidade, podendo ser resultado da interação entre diversos fatores.

Figura 16 – Modificação da cor do meio contendo tetraciclina ao longo do tempo nos ensaios com biomassa nitritante (a) 0 h e (b) 12 h e nitrificante (c) 0 h e (d) 12 h.

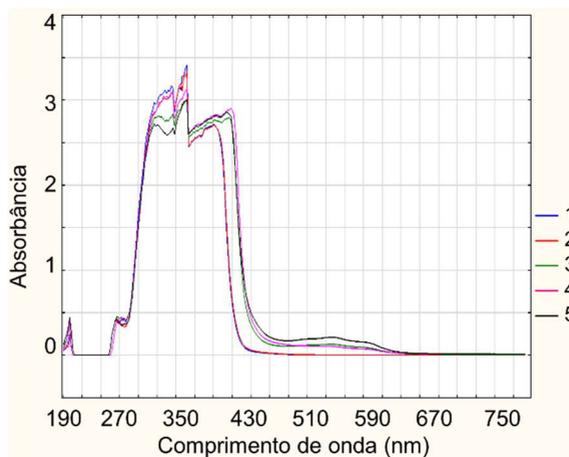


Fonte: Do autor.

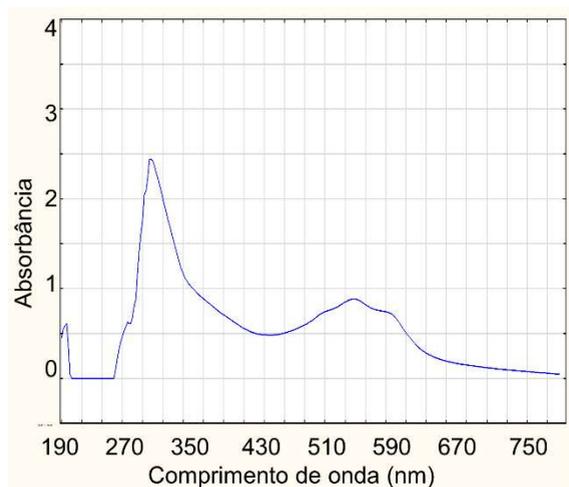
Com o intuito de investigar se algum dos componentes do meio ou das condições do processo poderiam contribuir para as alterações observadas durante os experimentos, foram preparadas diferentes soluções contendo tetraciclina e o meio de cultura usado nos experimentos. A varredura dessas amostras foi comparada com a amostra do ensaio cinético com biomassa nitritante que continha $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de tetraciclina e estão apresentadas na Figura 17.

Figura 17 – Varredura das amostras (a) soluções de tetraciclina $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$: 1 – em água; 2 – em meio sem NaHCO_3 ; 3 – em meio com $1,20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaHCO_3 ; 4 – em meio com o pH corrigido com KOH ; 5 – em meio com $2,39 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaHCO_3 ; e (b) ao final do ensaio cinético com biomassa nitritante e $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de tetraciclina.

(a)



(b)



Fonte: Do autor.

Foi observado na Figura 17 a formação de um platô entre 450 e 630 nm cuja absorvância aumentou com o aumento da concentração de

NaHCO₃. Este platô também esteve presente na amostra com correção do pH com KOH (amostra 4) porém de maneira menos pronunciada. Já na solução pura (1) e no meio contendo tetraciclina (2) este comportamento não foi observado. Além disso, na amostra do ponto final da cinética (Figura 17(b)) também foi observado um platô no mesmo comprimento de onda (450 – 630 nm), porém de forma mais pronunciada. Isso indica que o NaHCO₃ é o principal fator na possível degradação da tetraciclina, que também sofre influência do pH.

A influência do pH na degradação da tetraciclina já está bem reportada na literatura. O aumento ou a diminuição do pH podem favorecer reações de epimerização ou clivagem que podem ou não ser reversíveis (HALLING-SØRENSEN, 2002; CHOPRA, ROBERTS, 2001; NELSON, 1998). No entanto o efeito do NaHCO₃ sobre a degradação não está claro na literatura. A maioria dos trabalhos aborda a interação destes dois compostos com enfoque na mudança da absorção do antibiótico no corpo humano (NEUVONEN, 1976; BARR, ADIR, GARRETTSON, 1971) sem mencionar as mudanças na estrutura provocadas pelo bicarbonato.

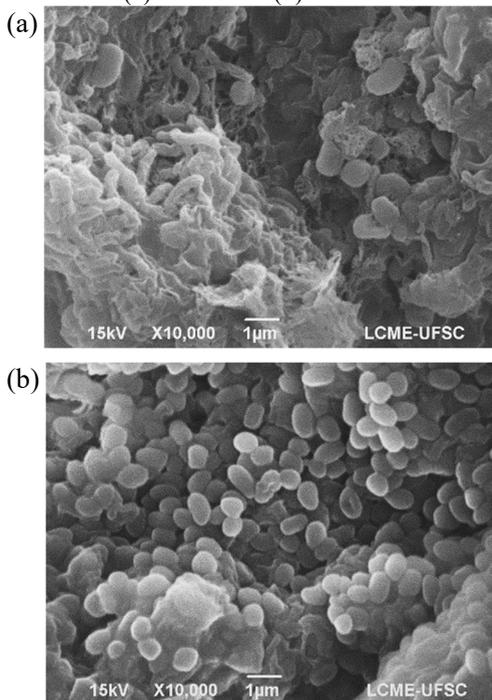
5.2.1.2 Efeito da tetraciclina na morfologia das culturas bacterianas

Um das implicações que a degradação da tetraciclina poderia provocar seria a formação de derivados que possuam atividade antimicrobiana com mecanismo de ação distinto do composto inicial. Alguns derivados como a 5a,6-anidrotetraciclina, 4-epi-anidrotetraciclina, apresentam efeito bactericida sobre as células podendo levar à lise celular (OLIVA et al., 1992; HALLING-SØRENSEN, 2002).

Neste sentido foram feitas análises de MEV para verificar possíveis mudanças na morfologia do floco bacteriano. Na Figura 18 estão apresentadas as imagens obtidas nas amostras controle (sem antibiótico) para as duas comunidades estudadas. É possível observar a coexistência de formas típicas de microrganismos presentes em culturas nitrificantes (FERRETTI, 2009; WATSON, MANDEL, 1971; JOHNSON, SIEBURTH, 1976; TSUNEDA et al., 2003) com bactérias filamentosas. A presença de microrganismos que não pertencem ao grupo de bactérias nitrificantes, mesmo em culturas enriquecidas é comum na literatura (FERRETTI, 2009; BRESSAN, 2012; PERAZOLLI, 2015; KATIPOGLU-YAZAN, 2015). De acordo com Ferretti (2009), a presença destes microrganismos é resultado das limitações de transferência de massa causadas pela estrutura maior e mais compactada

destes flocos que acaba favorecendo a formação de consórcios bacterianos. Já Bressan (2012) menciona a formação de bactérias heterotróficas que estariam consumindo matéria orgânica proveniente da morte celular e compostos orgânicos solúveis produzidos pelas bactérias nitrificantes.

Figura 18 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de biomassa (a) nitritante e (b) nitrificante.

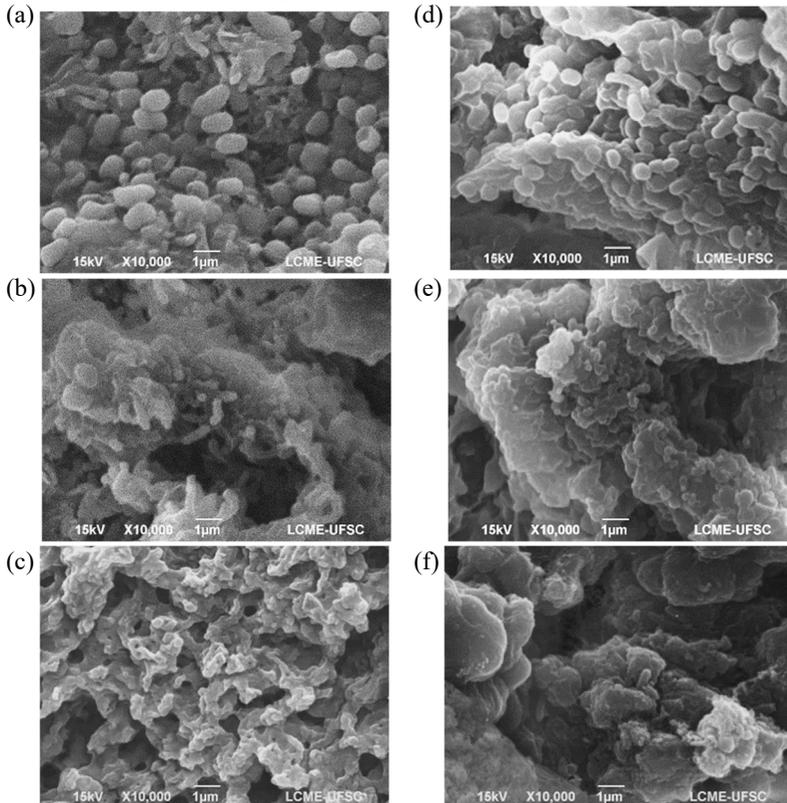


Fonte: Do autor

A exposição destas bactérias à tetraciclina provocou danos profundos na estrutura das duas comunidades bacterianas (Figura 19). Foi observado que o aumento da concentração de antibiótico dificultou a identificação das estruturas características das culturas nitritantes e nitrificantes observadas nas amostras controle (Figura 18). Esse comportamento é diferente ao esperado para a tetraciclina, uma vez que esta é caracterizada como um antibiótico de efeito bacteriostático (apenas impede a proliferação do microrganismo, sem causar morte celular). Tal resultado indica que, possivelmente, houve formação de um composto de

degradação com propriedades inibitórias distintas à da tetraciclina, no entanto, faz-se necessário a caracterização e identificação do mecanismo de ação deste composto. Alguns trabalhos já demonstraram que a exposição à tetraciclina pode provocar modificações na comunidade bacteriana, porém com tempos de exposição superiores a 12 h (MATOS et al., 2014; KATIPOGLU-YAZAN, 2015).

Figura 19 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de biomassa nitrificante expostas a (a) $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, (b) $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e (c) $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de tetraciclina e das amostras de biomassa nitrificante expostas a (d) $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, (e) $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e (f) $1.000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de tetraciclina.



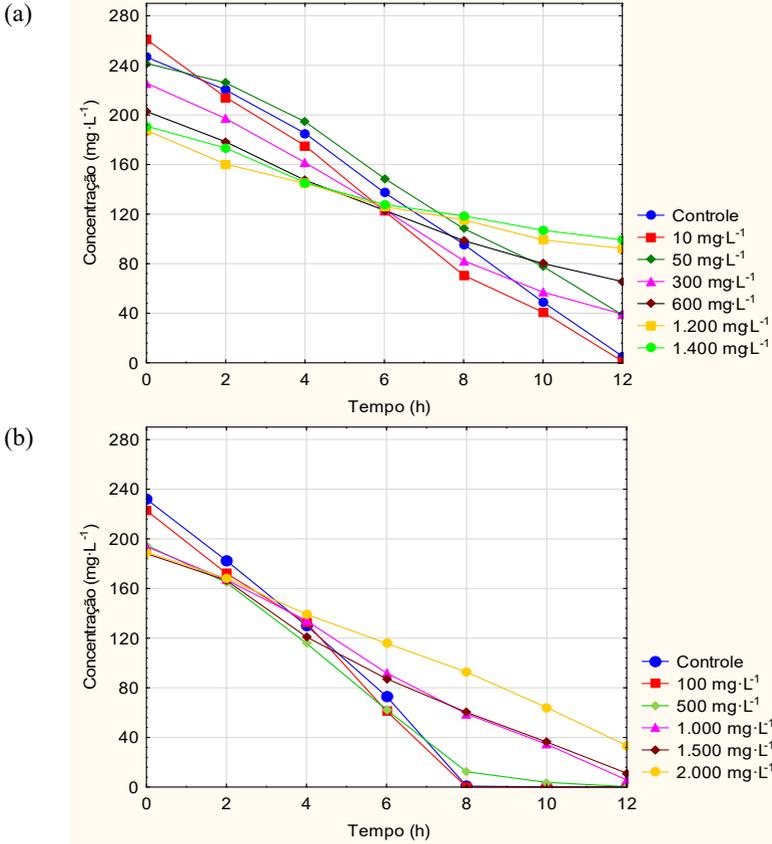
Fonte: Do autor.

5.2.2 Efeito da oxitetraciclina sobre as comunidades bacterianas

As biomassas nitrificante e nitrificante também foram expostas a diferentes concentrações de oxitetraciclina por 12 h e os perfis de consumo de nitrogênio na forma de amônio para cada condição experimental estão apresentados na Figura 20. Os resultados dos ensaios cinéticos contendo as concentrações das espécies nitrogenadas encontram-se nos Apêndices C e D e os gráficos estão apresentados respectivamente nas Figuras 21 e 22. Nos dois casos foi verificado que houve consumo de nitrogênio amoniacal até o final da cinética mesmo na presença de elevadas concentrações de antibiótico. Em relação à comunidade nitrificante, a conversão de amônia foi reduzida de 98% na amostra controle para 68% na presença de $1.400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de oxitetraciclina. Já nos ensaios com biomassa nitrificante foi observada a conversão completa de nitrogênio amoniacal na amostra controle em apenas 8 h, valor que foi reduzido para 51% na presença de $2.000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ do antibiótico, considerando o mesmo intervalo de tempo e para 82% ao final das 12 h.

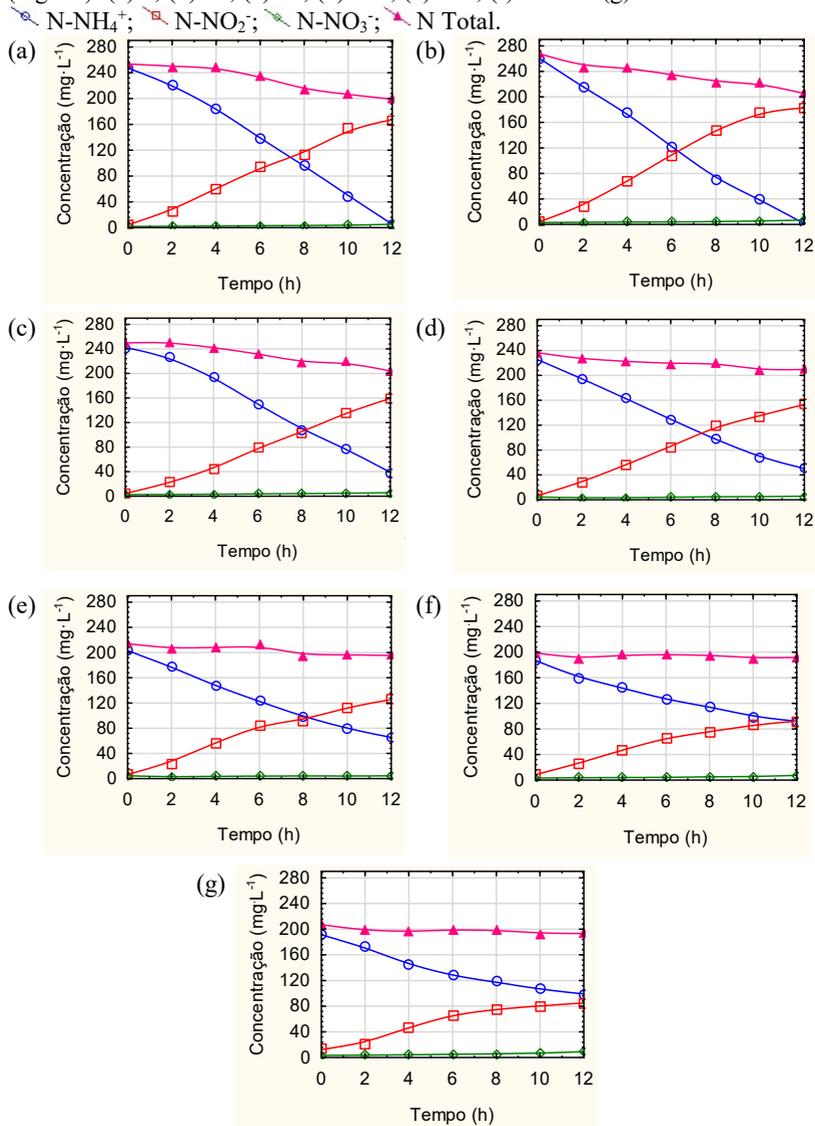
No que diz respeito às formas nitrogenadas nitrito e nitrato, os ensaios com biomassa nitrificante resultaram no acúmulo de nitrito sem produção significativa de nitrato, como era esperado. Nos ensaios com biomassa nitrificante foi observado novamente uma dependência da velocidade de formação do nitrato com a de consumo de amônia, assim como uma possível inibição das BONs pelo nitrito. No entanto, neste caso é possível que haja também um efeito inibitório da oxitetraciclina sobre a atividade das BONs. Comparando os resultados obtidos para o controle e o ensaio com $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ do antibiótico, percebe-se que em ambos a amônia foi totalmente consumida em 8 h, no entanto a produção de nitrato no controle foi de $128 \text{ N-NO}_3^- \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, valor que foi reduzido para $98 \text{ N-NO}_3^- \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ na presença de oxitetraciclina. Entretanto, faz-se necessária uma análise mais profunda para confirmar tal comportamento.

Figura 20 - Concentração de nitrogênio na forma de amônio ($N-NH_4^+$) em função do tempo para distintas concentrações de oxitetraciclina em bactérias (a) nitrificantes e (b) nitrificantes.



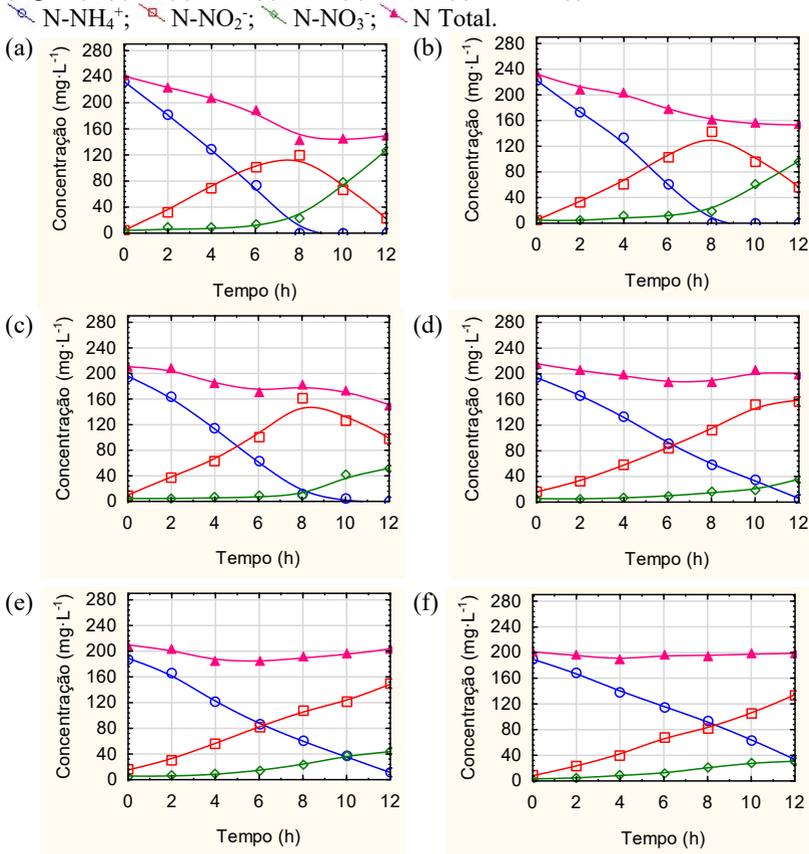
Fonte: Do autor.

Figura 21 – Concentração ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) das formas nitrogenadas em função do tempo (h) nos ensaios cinéticos de exposição das bactérias nitrificantes à oxitetraciclina ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$): (a) 0; (b) 10; (c) 50; (d) 300; (e) 600; (f) 1.200 e (g) 1.400.



Fonte: Do autor.

Figura 22 – Concentração ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) das formas nitrogenadas em função do tempo (h) nos ensaios cinéticos de exposição das bactérias nitrificantes à oxitetraciclina ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$): (a) 0; (b) 100; (c) 500; (d) 1.000; (e) 1.500 e (f) 2.000.



Fonte: Do autor.

Para calcular a inibição e identificar o CI-50, concentração de antibiótico que inibe a atividade bacteriana em 50%, foram utilizadas as velocidades de consumo de amônia. Os percentuais de inibição para os experimentos com biomassa nitritante e nitrificantes estão apresentados nas Tabelas 16 e 17, respectivamente. Na faixa de concentrações de oxitetraciclina testadas também foi identificado um efeito hormético sobre as duas comunidades (10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para nitritantes e 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para as nitrificantes) e, portanto, as concentrações que estimularam a atividade bacteriana foram desprezadas para o cálculo do modelo de inibição.

Tabela 16 – Velocidades máximas de consumo de amônia e percentuais de inibição de diferentes concentrações de oxitetraciclina sobre bactérias nitritantes.

OTC ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Log OTC	Velocidade máxima ($\text{mg N-NH}_4^+\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	Inibição (%)
0	-	22,96	0,00
10	1,00	24,72	-7,70
50	1,70	21,08	8,16
300	2,48	16,49	28,18
600	2,78	14,11	38,55
1200	3,08	12,29	47,17
1400	3,15	12,23	47,42

OTC: oxitetraciclina

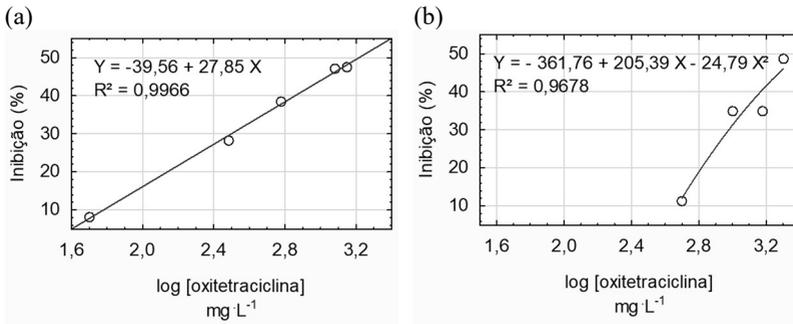
Tabela 17 – Velocidades máximas de consumo de amônia e percentuais de inibição de diferentes concentrações de oxitetraciclina sobre bactérias nitrificantes.

OTC ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Log OTC	Velocidade máxima ($\text{mg N-NH}_4^+\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	Inibição (%)
0	-	29,60	0,00
100	2,00	31,70	-7,09
500	2,70	26,24	11,35
1000	3,00	19,26	34,92
1500	3,18	19,26	34,92
2000	3,30	15,17	48,76

OTC: oxitetraciclina

Os resultados experimentais para os ensaios com bactérias nitritantes se ajustaram melhor a uma equação de primeiro grau. Para as nitrificantes o modelo com melhor ajuste foi um polinômio de segundo grau (Figura 23). No entanto, mesmo utilizando concentrações extremamente elevadas de oxitetraciclina não foi possível obter o CI-50 para nenhuma das comunidades bacterianas. Para fim de comparação entre os resultados, serão analisadas as concentrações de antibiótico que provocaram uma inibição de 25% na atividade bacteriana (CI-25). De acordo com a equação apresentada na Figura 23(a), o CI-25 para a cultura nitritante é igual a $208 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Já para as nitrificantes (Figura 23(b)), o CI-25 foi igual a $794 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de oxitetraciclina. Assim como foi observado para a tetraciclina, a maior complexidade da comunidade bacteriana diminui o efeito inibitório provocado pelo antibiótico.

Figura 23 – Correlação entre o grau de inibição da atividade bacteriana e o logaritmo da concentração de oxitetraciclina em comunidades (a) nitrificantes e (b) nitrificantes.



Fonte: Do autor.

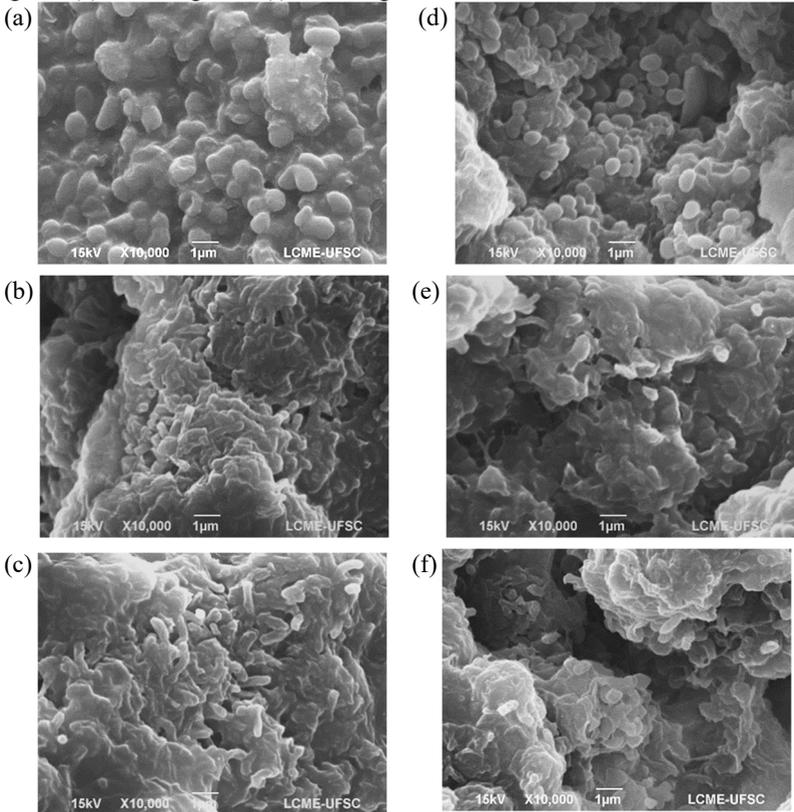
Alguns trabalhos presentes na literatura já demonstraram o efeito da oxitetraciclina sobre culturas nitrificantes, porém, assim como no caso da tetraciclina, foi identificada uma grande variação de resultados. Halling-Sørensen (2001) avaliou a inibição da oxitetraciclina sobre uma cultura pura de *N. europaea* e obteve um CI-50 de 1,7 mg·L⁻¹ em um ensaio com duração de 3 dias. Klaver e Matthews (1994) observaram o efeito a oxitetraciclina sobre uma formulação comercial de bactérias nitrificantes para a aquicultura durante 12 dias. Já na primeira concentração verificada por eles (12,5 mg·L⁻¹) foi observada redução da nitrificação de 59,2% com um CI-50 estimado variando de 8,60 a 26,96 mg·L⁻¹. Já os estudos conduzidos por Campos e colaboradores (2001) mostraram que, apesar de 10 mg·L⁻¹ de oxitetraciclina não inibir a nitrificação houve desintegração do biofilme e que a nitrificação foi inibida em 50% na presença de 250 mg·L⁻¹ do antibiótico após 10 dias de exposição.

Variações na coloração do meio também foram observadas durante os experimentos com a oxitetraciclina, indicando sua degradação. Neste caso, a cor inicialmente amarela da solução adquiriu tons mais escuros até alcançar uma cor marrom, porém somente em ensaios com concentração superior a 1.000 mg·L⁻¹. Uma vez que a tetraciclina e a oxitetraciclina possuem propriedades físico-químicas muito semelhantes (DAGHRIR; DROGUI, 2013), espera-se que os principais fatores que estejam causando esta modificação no meio sejam o pH e o NaHCO₃.

5.2.2.1 Efeito da oxitetraciclina na morfologia das culturas bacterianas

As micrografias (Figura 24) mostraram que a exposição das duas culturas bacterianas à oxitetraciclina provocou mudanças profundas em suas estruturas com o aumento da concentração de antibiótico. É possível verificar que as menores concentrações ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para as nitrificantes e $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para as nitrificantes) não modificaram as estruturas nitrificantes, com características muito semelhantes às amostras controle (Figura 18, p. 87). No entanto com o aumento da concentração de antibiótico a presença dessas estruturas foi reduzida significativamente, podendo ser observada apenas em alguns pontos das imagens. Uma vez que a oxitetraciclina possui efeito bacteriostático esse resultado é contrário ao inicialmente esperado, indicando uma possível modificação do mecanismo de ação devido à degradação ou às elevadas concentrações aplicadas nos ensaios.

Figura 24 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de biomassa nitrificante expostas a (a) $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, (b) $600 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e (c) $1.400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de oxitetraciclina e das amostras de biomassa nitrificante expostas a (d) $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, (e) $1.000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e (f) $2.000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de oxitetraciclina.



Fonte: Do autor.

5.2.3 Comparação entre os efeitos provocados pelos antibióticos sobre as comunidades bacterianas

Os experimentos realizados com os dois antibióticos demonstraram que a tetraciclina apresenta maior efeito inibitório sobre as duas comunidades bacterianas. Apesar de serem aplicadas concentrações extremamente elevadas de antibióticos e que não são comuns aos efluentes da suinocultura, o CI-50 somente foi alcançado quando as bactérias nitrificantes foram expostas à tetraciclina. Para este caso, o CI-50 foi de $273 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Para fins de comparação entre os efeitos provocados

pelos antibióticos nas comunidades estudadas, foi escolhido o ponto de CI-25 (concentração que inibiu a atividade bacteriana em 25%). Para a tetraciclina o CI-25 sobre as culturas nitrificante e nitrificante foi de 128 mg·L⁻¹ e 329 mg·L⁻¹, respectivamente. Já a oxitetraciclina teve o CI-25 de 208 mg·L⁻¹ para as bactérias nitrificantes e 794 mg·L⁻¹ para as nitrificantes. Estes valores representam um efeito inibitório da tetraciclina 1,63 vezes superior ao da oxitetraciclina para a comunidade nitrificante e 2,41 vezes superior para a nitrificante. Comparando com outros trabalhos realizados no Laboratório de Tratamento Biológico de Resíduos (LTBR) da UFSC que avaliaram a inibição de antibióticos e nanomateriais com propriedades antimicrobianas em culturas nitrificantes sob condições de trabalho muito similares (MICHELS, 2016; PERAZOLLI, 2015; BRESSAN, 2012), a tetraciclina e a oxitetraciclina apresentaram baixa inibição sobre esta comunidade e, a princípio, não causariam alteração do processo nas concentrações observadas no ambiente. Porém, isso não impede que haja modificação na estrutura e composição da comunidade microbiana, pois os efeitos inibitórios podem ficar mais evidentes com o tempo de operação dos processos.

Os efeitos destes antibióticos sobre comunidades biológicas podem variar, uma vez que cada organismo reage a estes compostos de maneira diferente. Steinmetz (2016) estudou o efeito destes dois antibióticos sobre culturas metanogênicas e obteve um CI-50 de 219 e 495 mg·L⁻¹ para tetraciclina e oxitetraciclina, respectivamente. Por sua vez, Wollenberger, Halling-Sørensen e Kusk (2000) observaram que o efeito destes antibióticos sobre a *Daphnia magna*, microrganismo comumente utilizado para medir a ecotoxicidade de compostos, não apresentaram relevância ambiental após 48h, porém foram reduzidos a 44,8 e 46,2 mg·L⁻¹ para tetraciclina e oxitetraciclina, respectivamente, para uma exposição de 30 dias. Já no trabalho conduzido por Halling-Sørensen (2001), uma cultura pura de *N. europaea* foi exposta à tetraciclina e oxitetraciclina por 3 dias obtendo CI-50 de 4,0 e 1,7 mg·L⁻¹, respectivamente.

Vale mencionar que trabalhar com altas concentrações de antibióticos trouxe algumas dificuldades para os ensaios cinéticos. Além de provocar queda do pH durante a preparação dos meios devido ao caráter ácido da solução de antibiótico, a extração do antibiótico necessitou ser repetida algumas vezes para que fosse alcançado o nível no qual a presença de antibiótico não interferisse nas análises e também impossibilitou a aferição da concentração celular pois uma fração do antibiótico ficava retida na membrana de acetato.

6 CONCLUSÕES

Com este trabalho foi possível obter culturas enriquecidas de bactérias nitrificantes. Além disso, as estratégias empregadas para reduzir a atividade das BONs (aeração intermitente e aumento da temperatura) foram suficientes para obter uma cultura com alta atividade de BOAs.

Em relação aos ensaios de inibição, foi possível concluir que a tetraciclina e a oxitetraciclina são capazes de inibir a atividade de culturas mistas de bactérias nitritantes e nitrificantes. Para os dois antibióticos testados, a cultura nitritante apresentou maior sensibilidade que a nitrificante e em ambas o efeito inibitório da tetraciclina foi maior que o da oxitetraciclina. Nas concentrações utilizadas somente foi possível encontrar o CI-50 para a comunidade nitritante exposta à tetraciclina, sendo este igual a $273 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Para comparação entre os resultados, foi analisado o CI-25 obtido em todos os experimentos sendo encontrado os seguintes valores: para a tetraciclina $128 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (nitritante), $329 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (nitrificante); para oxitetraciclina $208 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (nitritante) e $794 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (nitrificante). As análises de MEV permitiram observar modificações na morfologia das culturas bacterianas que podem ter sido provocadas por um mecanismo ainda não relatado na literatura. Tais resultados permitem concluir que a maior complexidade da comunidade bacteriana diminui o efeito inibitório dos dois antibióticos e que estes possuem baixa toxicidade sobre as culturas nitrificantes.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para continuidade deste trabalho, sugere-se explorar os seguintes aspectos:

- Avaliar o efeito inibitório provocado pela exposição prolongada aos dois antibióticos sobre as comunidades bacterianas.
- Avaliar a influência destes antibióticos sobre a expressão gênica das comunidades bacterianas buscando relacioná-lo com modificações da composição bacteriana.
- Avaliar o efeito inibitório destes antibióticos sobre as bactérias oxidadoras de nitrito (BON), isoladamente.
- Verificar a degradação da tetraciclina e da oxitetraciclina sobre as condições empregadas no processo de nitrificação (pH, temperatura e aeração).
- Estudar a interação que ocorre entre a tetraciclina e o bicarbonato de sódio.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F. M. Changes in the use of antimicrobials and the effects on productivity of swine farms in Denmark. **AJVR**, [s.i.], v. 71, n. 7, p. 726-733, jul. 2010.
- ALEXANDRATOS, N.; BRUINSMA, J.. **World agriculture towards 2030/2050**: The 2012 revision. Roma: FAO, 2012. 147 p.
- AMARAL, A. L. et al. **Boas práticas de produção de suínos**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2006. 60 p. (Circular Técnica).
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21 ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2005.
- ANVISA. **Antimicrobianos: Bases teóricas e uso clínico**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo1/antimicrobianos.htm#>. Acesso em: 2 dez. 2017.
- ANTHONISEN, A. C. et al. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. **Journal of the Water Pollution Control Federation**, [s.i.], v. 48, p.835-852, 1976.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA). **Relatório Anual - 2017**. São Paulo: ABPA, 2017. 133 p.
- AUST, M. O. et al. Distribution of sulfamethazine, chlortetracycline and tylosin in manure and soil of Canadian feedlots after subtherapeutic use in cattle. **Environmental Pollution**, [s.i.], v. 156, n. 3, p.1243-1251, dez. 2008.
- BARCELLOS, D. E. S. N. et al. Aspectos práticos sobre o uso de antimicrobianos em suinocultura. **Acta Scientiae Veterinariae**, [s.i.], v. 37, n. 1, p.151-155, 2009.
- BARR, W. H.; ADIR, J.; GARRETTSON, L.. Decrease of tetracycline absorption in man by sodium bicarbonate. **Clinical Pharmacology And Therapeutics**, [s.i.], v. 12, n. 5, p.779-784, jun. 1971.

BARTON, M. D.. Impact of antibiotic use in the swine industry. **Current Opinion In Microbiology**, [s.l.], v. 19, p.9-15, jun. 2014.

BENTLEY, R. Mycophenolic Acid: A One Hundred Year Odyssey from Antibiotic to Immunosuppressant. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 100, n. 10, p.3801-3826, out. 2000.

BERNET, N.; BÉLINE, F. Challenges and innovations on biological treatment of livestock effluents. **Bioresource Technology**, [s.i.], v. 100, n. 22, p. 5431–5436, 2009.

BERNET, N.; SPÉRANDIO, M. Principles of nitrifying processes. In: **Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution: Principle and Engineering**. IWA Publishing. London, UK, 2009.

BERNHARD, A.. **The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact**. 2010. Disponível em: <<https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/the-nitrogen-cycle-processes-players-and-human-15644632>>. Acesso em: 05 ago. 2017.

BORGHI, A. A.; A.PALMA, M. S.. Tetracycline: production, waste treatment and environmental impact assessment. **Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 50, n. 1, p.25-40, mar. 2014.

BITTON, G. **Wastewater Microbiology**. 3 ed. Wiley, 2005.

BRASIL. Instrução Normativa nº 26, de 10 de julho de 2009. Brasília, 10 jul. 2009.

BRESSAN, C.R. **Toxicidade do antibiótico sulfato de colistina empregado na suinocultura sobre processos microbiológicos relacionados ao tratamento de efluentes**. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina. 2012.

CAMPAGNOLO, E. R. et al. Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale swine and poultry feeding operations. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 299, n. 1-3, p.89-95, nov. 2002.

CAMPOS, J. L. et al. Nitrification at high ammonia loading rates in anactivated sludge unit. **Bioresource Technology**, vol. 68, p. 141-148, 1999.

CAMPOS, J. L. et al. Effect of two broad-spectrum antibiotics on activity and stability of continuous nitrifying system. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, [s.i.], v. 95, n. 1, p.1-10, mar. 2001.

CASEWELL, M. et al. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.i.], v. 52, n. 2, p. 159–161, 2003.

CATALDO, D. A. et al.. **Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. Comum Soil Sci Plant Anal.**, vol 6, p.71-80, 1975.

CHATTOPADHYAY, M. K.. Use of antibiotics as feed additives: a burning question. **Frontiers In Microbiology**, [s.i.], v. 5, p.1-3, 2 jul. 2014.

CHEN, A. et al. Effects of tetracycline on simultaneous biological wastewater nitrogen and phosphorus removal. **Rsc Advances**, [s.i.], v. 5, n. 73, p.59326-59334, 2015.

CHOI, O.; DENG, K.K.; KIM, N.J.; ROSS JR.; L., SURAMPALLI, R.Y. e HU, Z.. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. **Water Research**, vol. 42, p. 3066-3074, 2008.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M.. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, [s.i.], v. 65, n. 2, p.232-260, 1 jun. 2001.

COLAIZZI, J. L.; KNEVEL, A. M.; MARTIN, A. N.. Biophysical Study of the Mode of Action of the Tetracycline Antibiotics. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [s.i.], p.1425-1436, jun. 1965.

CUI, H. et al. Influence of ciprofloxacin on microbial community structure and function in soils. **Biology And Fertility Of Soils**, [s.l.], v. 50, n. 6, p.939-947, mar. 2014.

DAGHRIR, R.; DROGUI, P.. Tetracycline antibiotics in the environment: a review. **Environmental Chemistry Letters**, [s.i.], v. 11, n. 3, p.209-227, mar. 2013.

Environmental Protection Agency (EPA). **Manual: Nitrogen Control**. Washington: EPA, 1993. 326 p.

EUROPEAN UNION. Regulation (EC) n° 1831, de 22 de julho de 2003. **On Additives For Use In Animal Nutrition**. [S.I.]: European Parliament, 22 jul. 2003. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/En/TXT/PDF/?uri=CELEX:02003R1831-20100901&rid=1>>. Acesso em: 24 dez. 2017.

FERRETTI, E. C. **Remoção de nitrogênio via nitrito de efluentes com elevadas concentrações de nitrogênio e baixas relações DQO/N em reator operado na forma de bateladas sequenciais (SBR)**. Tese (Doutorado). Departamento de Engenharia Química e de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2009.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-Producing Animals**. [s.i.]: FDA, 2016. 58 p. (Summary Report 2015).

FUNDAÇÃO DO MEIO AMBIENTE (FATMA) (Estado). Instrução Normativa n° 11, de outubro de 2014. Suinocultura. Florianópolis, SC: Fatma, Disponível em: <http://www.fatma.sc.gov.br/ckfinder/userfiles/arquivos/ins/11/IN_11_Suinocultura.pdf>. Acesso em: 21 dez. 2017.

GAO, P. et al. Occurrence of pharmaceuticals in a municipal wastewater treatment plant: Mass balance and removal processes. **Chemosphere**, [s.l.], v. 88, n. 1, p.17-24, jun. 2012.

GIEHL, A. L.. **Boletim agropecuário: Operação Carne Fraca**. Florianópolis: EPAGRI/CEPA, 2017. 23 p.

HALLING-SØRENSEN, B. et al. Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and

ciprofloxacin. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.i.], v. 46, n. 1, p.53-58, 2000.

HALLING-SØRENSEN, B.. Inhibition of Aerobic Growth and Nitrification of Bacteria in Sewage Sludge by Antibacterial Agents. **Archives Of Environmental Contamination And Toxicology**, [s.i.], v. 40, n. 4, p.451-460, abr. 2001.

HALLING-SØRENSEN, B.; SENDEL, G.. Toxicity of Tetracyclines and Tetracycline Degradation Products to Environmentally Relevant Bacteria, Including Selected Tetracycline-Resistant Bacteria. **Archives Of Environmental Contamination And Toxicology**, [s.i.], v. 42, n. 3, p.263-271, 1 mar. 2002.

HELLINGA, C. et al. The SHARON process: An innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich wastewater. **Water Science and Technology**, [s.i], v. 37, n. 9, p. 135-142, 1998.

HENZE. M. et al. *Wastewater treatment: biological and chemical process*. 2. ed. Germany: Springer Verlag, 1997.

HIRSCH, R. et al. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. **Science Of The Total Environment**, [s.i.], v. 225, n. 1-2, p.109-118, jan. 1999.

HOU, J. et al. The occurrence and fate of tetracyclines in two pharmaceutical wastewater treatment plants of Northern China. **Environmental Science And Pollution Research**, [s.i.], v. 23, n. 2, p.1722-1731, 22 set. 2015.

HUANG, X. et al. Mechanistic model for interpreting the toxic effects of sulfonamides on nitrification. **Journal Of Hazardous Materials**, [s.i.], v. 305, p.123-129, mar. 2016.

HUGHES, J. L.. **Inhibition of the ammonia oxidizing bacteria *Nitrosomonas europaea* by the emerging contaminant triclosan**. 2013. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Ambiental, Oregon State University, Corvallis, 2013.

HUGHES, P.; HERITAGE, J.. Antibiotic growth-promoters in food animals. In: FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE

UNITED NATIONS. **Assessing quality and safety of animal feeds**. Roma: FAO, 2004. Cap. 6. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/007/y5159e/y5159e08.htm>>. Acesso em: 24 dez. 2017.

IBRAHEEM, J. A.; ABDUL-AHAD, M. Y.. Detection of Tetracycline, Doxycycline, Chlortetracycline, and Oxytetracycline Antibiotics in Nineveha Drug Wastewater. **Nahrain University, College Of Engineering Journal**, [s.i.], v. 15, n. 2, p.215-221, fev. 2012.

ITO, M.; GUIMARÃES, D.; AMARAL, G.. Impactos ambientais da suinocultura: desafios e oportunidades. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro: BNDES, n. 44, p.125-156, set. 2016.

JIA, A. et al. Simultaneous determination of tetracyclines and their degradation products in environmental waters by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Journal Of Chromatography A**, [s.i.], v. 1216, n. 22, p.4655-4662, maio 2009.

JJEMBA, P. K.. Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [s.i.], v. 63, n. 1, p.113-130, jan. 2006.

JOHNSON, P. W.; SIEBURTH, J. M.. In Situ Morphology of Nitrifying-Like Bacteria in Aquaculture Systems. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.i.], v. 31, n. 3, p.423-432, mar. 1976.

KARTHIKEYAN, K.G.; MEYER, M. T.. Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. **Science Of The Total Environment**, [s.i.], v. 361, n. 1-3, p.196-207, maio 2006.

KATIPOGLU-YAZAN, T. et al. Chronic impact of tetracycline on nitrification kinetics and the activity of enriched nitrifying microbial culture. **Water Research**, [s.i.], v. 72, p.227-238, abr. 2015.

KIM, S.; AGA, D. S.. Potential Ecological and Human Health Impacts of Antibiotics and Antibiotic-Resistant Bacteria from Wastewater Treatment Plants. **Journal Of Toxicology And Environmental Health, Part B**, [s.i.], v. 10, n. 8, p.559-573, 23 nov. 2007.

KLAVEI, A. L.; MATTHEWS, R. A.. Effects of oxytetracycline on nitrification in a model aquatic system. **Aquaculture**, [s.i.], v. 123, p.237-247, 1994.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment: a review -Part I. **Chemosphere**, [s.i.], v. 75, n. 4, p. 417-434, 2009a.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment: a review -Part II. **Chemosphere**, [s.i.], v. 75, n. 4, p. 435-441, 2009b.

KUNZ, A.. Impactos sobre a disposição inadequada de dejetos de animais sobre a qualidade de águas superficiais e subterrâneas In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE USO DA ÁGUA NA AGRICULTURA, II, 2006, Passo Fundo. Artigos... Passo Fundo: UFP, 2006. Disponível em: <<http://cbhpf.upf.br/index.php/conteudo/artigos/category/20-ii-simposio-nac-sobre-o-uso-da-agua-na-agricultura>> Acesso em: 20 dezembro 2017.

KUNZ, A.; MIELE, M.; STEINMETZ, R. L. R. Advanced swine manure treatment and utilization in Brazil. **Bioresource Technology**, [s.i.], v. 100, n. 22, p. 5485-5489, Nov 2009.

LIAO, P. H.; CHEN, A.; LO, K. V.. Removal of nitrogen from swine manure wastewaters by ammonia stripping. **Bioresource Technology**, [s.i.], v. 54, p.17-20, jun. 1995.

LIN, A. Y. C.; YU, T. H.; LIN, C. F.. Pharmaceutical contamination in residential, industrial, and agricultural waste streams: Risk to aqueous environments in Taiwan. **Chemosphere**, [s.i.], v. 74, n. 1, p.131-141, dez. 2008.

LIU, Z. et al. Inhibitory effects and biotransformation potential of ciprofloxacin under anoxic/anaerobic conditions. **Bioresource Technology**, [s.i.], v. 150, p.28-35, dez. 2013.

LUSK, J. L.; NORWOOD, F. B.; PRUITT, J. R.. Consumer Demand for a Ban on Antibiotic Drug Use in Pork Production. **American Journal Of Agricultural Economics**, [s.i.], v. 88, n. 4, p.1015-1033, 1 nov. 2006.

MACDOUGALL, C.; CHAMBERS, H. F.. Inibidores da síntese de proteínas e agentes antibacterianos diversos. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C.. **As bases farmacológicas da**

terapêutica de Goodman & Gilman. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012. Cap. 55. p. 1521-1547.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock.** 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MARTÍNEZ-CARBALLO, E. et al. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. **Environmental Pollution**, [s. I], v. 148, n. 2, p. 570–579, 2007.

MAPA. **Lista de substâncias proibidas e legislação correspondente.** 2017. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/arquivos-de-insumos-pecuarios/Substanciasproibidas.pdf> >. Acesso em 20 dez 2017.

MATOS, M. et al. Influence of tetracycline on the microbial community composition and activity of nitrifying biofilms. **Chemosphere**, [s.l.], v. 117, p.295-302, dez. 2014.

MERLIN, C.; LOUVET, J.; POTIER, O.. Effect of antibiotics on biological wastewater treatment processes. In: GOLDSTEIN, W. E. (Org.). **Pharmaceutical Accumulation in the Environment: Prevention, Control, Health Effects, and Economic Impact.** Boca Raton: Crc Press, 2014. Cap. 8. p. 117-154.

METCALF & EDDY, INC. **Wastewater engineering treatment disposal reuse.** 4. ed. New York, McGraw - Hill Book, 1815p. 2003.

MIAO, X. S. et al. Occurrence of Antimicrobials in the Final Effluents of Wastewater Treatment Plants in Canada. **Environmental Science & Technology**, [s.l.], v. 38, n. 13, p.3533-3541, jul. 2004.

MICHAEL, I. et al. Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: A review. **Water Research**, [s.l.], v. 47, n. 3, p.957-995, mar. 2013.

MICHALOVA, E.; NOVOTNA, P.; SCHLEGLOVA, J.. Tetracyclines in veterinary medicine and bacterial resistance to them. **Med. Vet.**, [s.i.], v. 49, n. 3, p.79-100, 2004.

MICHELS, C. **Efeito Inibitório de Nanopartículas de Prata na Atividade de Bactérias Oxidadoras de Amônia.** Tese (Doutorado).

Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina. 2016.

MIGLIORE, L.; ROTINI, A.; THALLER, M. Low Doses of Tetracycline Trigger the E. coli Growth: A Case of Hormetic Response. **Dose-response**, [s.l.], v. 11, n. 4, p.565-572, maio 2013.

NATION, J. L. A new method using hexamethyldisilazane for preparation of soft tissues for scanning electron microscopy. **Stain Technology**, v. 58, p. 347-351, 1983.

NELSON, M.I. Chemical and Biological Dynamics of Tetracyclines. **Advances In Dental Research**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.5-11, nov. 1998.

NEUVONEN, P. J.. Interactions with the Absorption of Tetracyclines. **Drugs**, [s.i.], v. 11, p.45-54, 1976.

NICOLAOU, K. C.; RIGOL, S.. A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. **The Journal Of Antibiotics**, [s.l.], v. 71, n. 2, p.153-184, jul. 2017.

OHLSEN, K. et al. Effects of Subinhibitory Concentrations of Antibiotics on Alpha-Toxin (hla) Gene Expression of Methicillin-Sensitive and Methicillin Resistant Staphylococcus aureus Isolates. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [s.i.], v. 42, n. 11, p.2817-2823, nov. 1998.

OLIVA, B et al. Evidence that tetracycline analogs whose primary target is not the bacterial ribosome cause lysis of Escherichia coli. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [s.l.], v. 36, n. 5, p.913-919, maio 1992.

PERAZZOLI, S. **Avaliação do efeito das nanopartículas de óxido de ferro sobre uma comunidade de bactérias oxidadoras de amônia (BOAs)**. Dissertação (Mestrado). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina. 2015.

PEREIRA-MAIA, E. C. et al. Tetraciclina e Gliciliclinas: uma visão geral. **Química Nova**, [s.i.], v. 33, n. 3, p.700-706, fev. 2010.

RAUTENBACH, M. et al. Analyses of dose-response curves to compare the antimicrobial activity of model cationic alpha-helical peptides highlights the necessity for a minimum of two activity parameters. **Analytical Biochemistry**, v. 350, n. 1, p. 81-90, Mar, 2006.

RITTMANN, B. E.; MCCARTY, P. L. **Environmental biotechnology: principles and applications**. New York: McGraw Hill Book Co, 2001.

SALYERS, A. A.. An overview of the genetic basis of antibiotic resistance in bacteria and its implications for agriculture. **Animal Biotechnology**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.1-5, jul. 2002.

SCHMIDELL, W.; SOARES, H. M., *et al* (Ed.). **Tratamento Biológico de Águas Residuárias**: CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, 2007.

SEGANFREDO, M. A. Os dejetos de suínos são um fertilizante ou um poluente do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, [s. i], v. 16, n. 3, p. 129-141, 1999.

STEINMETZ, R. L. R. **Avaliação do Efeito de Drogas Veterinárias na Produção Específica de Biogás de Substratos Agropecuários**. Tese (Doutorado). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina. 2016.

TAVARES, J. M. R. **Consumo de água e produção de dejetos na suinocultura**. Dissertação (Mestrado). Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFSC, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2012.

TIEDJE, J. M. et al. Denitrification: ecological niches, competition and survival. **Antonie van Leeuwenhoek**, [s.i.], v. 48, n. 6, p.569-583, 1982.

TIEDJE, J. M.. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In: ZHENDER, A. J. B..**Biology of anaerobic microorganisms**. New York. John Wiley & Sons. Inc. cap. 4, p. 179-245, 1988.

TOPAL, M.; TOPAL, E. I. A.. Occurrence and fate of tetracycline and degradation products in municipal biological wastewater treatment plant

and transport of them in surface water. **Environmental Monitoring And Assessment**, [s.l.], v. 187, n. 12, p.1-9, nov. 2015.

TSUNEDA, S. Characterization of nitrifying granules produced in an aerobic upflow fluidized bed reactor. **Water Research**, [s.l.], v. 37, n. 20, p.4965-4973, dez. 2003.

VARESCHE, M. B., et al. Microbial colonization of polyurethane foam matrices in horizontal-flow anaerobic immobilized-sludge reactor. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.48, p. 534-538, 1997.

VAN BOECKEL, T. P. et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 112, n. 18, p.5649-5654, mar. 2015.

VETERINARY MEDICINES DIRECTORATE, **Sales of antimicrobial products authorizes for use as veterinary medicines, growth promoters, coccidiostats and antiprotozoals, in UK in 2001**. [s.i.]: VMD, 2001. 31 p. Disponível em: < <https://www.noah.co.uk/wp-content/uploads/2016/04/antimicrosales2001.pdf>>. Acesso em 30 dez 2017.

VISHNIAC, W.; SANTER, M.. The Thiobacilli. **Bacteriology Review**, [s.i.], v. 21, n. 1, p.195-213, 1957.

VITOUSEK, P. M. et al. Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. **Ecological Applications**, [s.i.], v. 7, n. 3, p.737-750, 1997.

VOGEL, A. I. **Análise Inorgânica Quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002.

WATSON, S. W.; MANDEL, M.. Comparison of the Morphology and Deoxyribonucleic Acid Composition of 27 Strains of Nitrifying Bacteria. **Journal Of Bacteriology**, [s.i.], v. 107, n. 2, p.563-569, ago. 1971.

WOLLENBERGER, L.; HALLING-SØRENSEN, B.; KUSK, K.O.. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. **Chemosphere**, [s.i.], v. 40, p.723-730, 2000.

YANG, S.; CHA, J.; CARLSON, K.. Simultaneous extraction and analysis of 11 tetracycline and sulfonamide antibiotics in influent and effluent domestic wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1097, n. 1-2, p.40-53, dez. 2005.

ZDRADEK, C. P. **Seleção de linhagens oxidadoras de amônio e remoção de nitrogênio via nitrito em reator descontínuo alimentado (SBR), sob condições de limitação de oxigênio** Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina 2005.

ZDRADEK, C.P.; SCHMIDELL, W. e SOARES, H.M. **Determinação da concentração de sólidos totais: comparação entre os resultados obtidos em estufa convencional e em forno microondas**. XI MET - Encontro Nacional de Metodologias de Laboratório, SCBrasil. Anais p. 36, 2006.

ZHANG, X. et al. Occurrence, removal, and risk assessment of antibiotics in 12 wastewater treatment plants from Dalian, China. **Environmental Science And Pollution Research**, [s.l.], v. 24, n. 19, p.16478-16487, maio 2017.

APÊNDICE A

Ensaio cinéticos para avaliação do efeito da tetraciclina sobre as bactérias nitrificantes

- ENSAIOS REALIZADOS EM 07/11/2017:

1) Controle

Tempo (h)	pH	N-NH ₄ ⁺ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N total (mg·L ⁻¹)
0	7,57	267,28	14,20	3,52	285,00
2	7,58	230,84	28,46	4,21	263,51
4	7,54	183,57	59,74	4,29	247,60
6	7,26	151,11	79,06	3,95	234,12
8	7,12	110,11	101,90	5,67	217,68
10	6,83	55,91	139,15	6,53	201,59
12	6,97	25,44	168,67	7,64	201,75

2) 3 mg·L⁻¹ de tetraciclina

Tempo (h)	pH	N-NH ₄ ⁺ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N total (mg·L ⁻¹)
0	7,59	224,57	14,58	2,75	241,90
2	7,48	201,22	29,52	3,87	234,61
4	7,28	199,51	61,84	3,01	264,37
6	7,22	143,71	80,12	6,53	230,35
8	7,01	95,30	121,23	6,53	223,06
10	6,95	50,78	163,75	9,44	223,98
12	7,2	19,18	189,75	9,62	218,54

3) 30 mg·L⁻¹ de tetraciclina

Tempo (h)	pH	N-NH ₄ ⁺ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N total (mg·L ⁻¹)
0	7,59	237,10	14,76	2,41	254,26
2	7,33	208,06	38,30	2,66	249,02
4	7,15	187,56	80,12	3,01	270,68
6	7,03	131,18	108,93	3,87	243,97
8	6,81	75,37	150,04	5,41	230,82
10	6,98	45,66	178,51	5,67	229,83
12	7,44	7,50	193,97	5,75	207,22

4) 100 mg·L⁻¹ de tetraciclina

Tempo (h)	pH	N-NH ₄ ⁺ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N total (mg·L ⁻¹)
0	7,59	224,00	14,06	1,98	240,03
2	7,33	190,97	38,48	2,84	232,29
4	7,15	143,71	85,39	4,12	233,22
6	7,03	116,37	113,85	5,75	235,98
8	6,81	78,79	149,34	6,78	234,91
10	6,98	62,46	167,26	9,27	238,99
12	7,47	38,25	189,75	7,47	235,47

5) 300 mg·L⁻¹ de tetraciclina

Tempo (h)	pH	N-NH ₄ ⁺ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N total (mg·L ⁻¹)
0	7,56	233,68	15,64	1,46	250,78
2	7,42	209,77	35,31	2,15	247,23
4	7,39	192,68	56,93	3,18	252,79
6	7,58	183,57	61,84	2,32	247,73
8	7,8	176,74	67,47	2,92	247,12
10	7,82	180,15	68,87	3,44	252,46
12	7,86	176,17	70,63	3,44	250,23

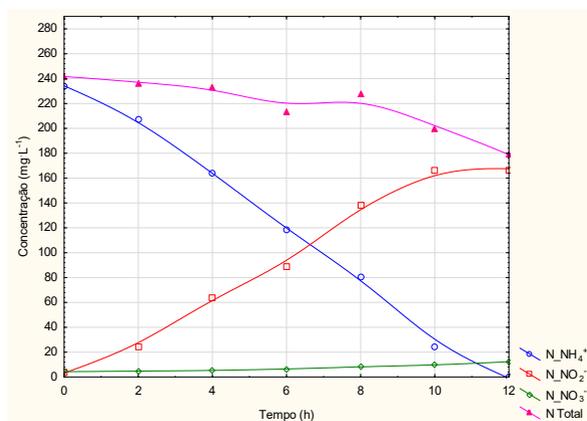
6) 500 mg·L⁻¹ de tetraciclina

Tempo (h)	pH	N-NH ₄ ⁺ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N total (mg·L ⁻¹)
0	7,5	222,29	14,58	0,60	237,48
2	7,58	203,50	18,45	1,63	223,58
4	7,85	202,36	22,49	1,89	226,74
6	7,83	212,04	23,54	1,89	237,48
8	7,84	213,18	24,25	3,01	240,44
10	7,83	210,90	24,60	3,61	239,11
12	7,83	201,79	33,03	3,87	238,69

- ENSAIOS REALIZADOS EM 11/12/2017:

1) Controle

Tempo (h)	pH	N-NH ₄ ⁺ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N total (mg·L ⁻¹)
0	7,64	233,68	3,80	4,29	241,77
2	7,6	207,49	24,07	4,90	236,45
4	7,38	164,21	63,95	5,24	233,40
6	7,21	129,47	88,90	6,44	224,81
8	7,06	78,12	138,45	8,41	224,98
10	7,04	24,30	166,21	9,53	200,04
12	7,59	0,02	166,56	12,36	178,94

2) 200 mg·L⁻¹ de tetraciclina

Tempo (h)	pH	N-NH ₄ ⁺ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N total (mg·L ⁻¹)
0	7,64	215,46	3,37	2,92	221,75
2	7,62	192,68	20,21	3,69	216,58
4	7,72	165,92	37,95	3,61	207,47
6	7,94	160,79	39,36	3,95	204,10
8	8,09	159,65	41,82	4,21	205,68
10	8,07	157,37	43,92	5,41	206,71
12	8,03	161,36	47,44	5,84	214,64

3) 400 mg·L⁻¹ de tetraciclina

Tempo (h)	pH	N-NH₄⁺ (mg·L⁻¹)	N-NO₂⁻ (mg·L⁻¹)	N-NO₃⁻ (mg·L⁻¹)	N total (mg·L⁻¹)
0	7,63	208,63	5,06	1,98	215,66
2	7,51	188,13	23,37	2,58	214,07
4	7,97	186,99	26,35	3,61	216,95
6	7,9	183,57	29,69	4,38	217,64
8	8,02	176,74	31,80	4,64	213,17
10	8,15	171,04	36,02	4,64	211,70
12	8,29	171,04	36,37	4,55	211,96

APÊNDICE B

Ensaio cinéticos para avaliação do efeito da tetraciclina sobre as bactérias nitrificantes

- ENSAIOS REALIZADOS EM 09/01/2018:

1) Controle

Tempo (h)	pH	N-NH ₄ ⁺ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N total (mg·L ⁻¹)
0	7,632	220,59	5,38	5,58	231,54
2	7,538	173,32	31,82	8,16	213,30
4	7,481	136,30	63,01	10,05	209,36
6	7,346	97,58	87,75	10,05	195,37
8	7,08	52,78	123,81	13,91	190,50
10	7,15	0,00	105,73	30,39	136,04
12	7,72	0,00	55,89	91,00	146,89

2) 100 mg·L⁻¹ de tetraciclina

Tempo (h)	pH	N-NH ₄ ⁺ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N total (mg·L ⁻¹)
0	7,61	215,46	6,54	4,29	226,29
2	7,774	185,85	24,25	7,30	217,40
4	7,656	165,92	43,45	6,87	216,24
6	7,472	139,15	60,43	6,27	205,85
8	7,321	111,15	82,84	14,94	208,93
10	7,247	69,86	109,79	10,48	190,12
12	7,081	23,16	135,26	18,72	177,14

3) 250 mg·L⁻¹ de tetraciclina

Tempo (h)	pH	N-NH ₄ ⁺ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N total (mg·L ⁻¹)
0	7,605	208,63	6,41	4,55	219,59
2	7,481	189,26	26,84	7,56	223,66
4	7,468	139,15	47,70	10,56	197,41
6	7,468	117,51	51,76	25,58	194,85
8	7,529	114,56	33,67	44,47	192,70
10	7,765	101,75	13,50	77,26	192,51
12	7,848	94,06	8,48	88,25	190,79

4) 500 mg·L⁻¹ de tetraciclina

Tempo (h)	pH	N-NH ₄ ⁺ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N total (mg·L ⁻¹)
0	7,626	202,36	14,53	7,30	224,19
2	7,546	172,18	23,70	9,36	205,24
4	7,584	150,54	33,67	17,26	201,46
6	7,525	134,59	25,92	30,65	191,16
8	7,75	119,22	14,10	53,05	186,37
10	7,812	114,09	11,52	73,83	199,44
12	8,112	111,25	9,12	74,69	195,05

5) 750 mg·L⁻¹ de tetraciclina

Tempo (h)	pH	N-NH ₄ ⁺ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N total (mg·L ⁻¹)
0	7,634	203,50	8,20	6,10	217,79
2	7,548	181,29	20,75	8,59	210,63
4	7,594	149,97	25,36	19,06	194,39
6	7,637	137,44	16,69	36,74	190,87
8	8,021	132,89	15,03	39,32	187,23
10	7,825	126,62	14,84	41,38	182,84
12	8,013	124,91	15,39	44,47	184,78

6) 1.000 mg·L⁻¹ de tetraciclina

Tempo (h)	pH	N-NH ₄ ⁺ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N total (mg·L ⁻¹)
0	7,638	201,22	9,86	3,95	215,03
2	7,375	182,43	26,65	7,30	216,38
4	7,625	151,11	27,02	18,20	196,33
6	7,672	150,54	22,04	24,55	197,13
8	7,827	149,97	22,22	27,73	199,92
10	7,815	140,86	17,61	28,16	186,63
12	7,869	138,01	17,24	29,62	184,87

APÊNDICE C

Ensaio cinéticos para avaliação do efeito da oxitetraciclina sobre as bactérias nitrificantes

- ENSAIOS REALIZADOS EM 21/11/2017:

1) Controle

Tempo (h)	pH	N-NH ₄ ⁺ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N total (mg·L ⁻¹)
0	7,58	246,68	5,08	1,81	253,57
2	7,51	220,20	26,28	2,15	248,63
4	7,5	185,18	60,43	2,66	248,27
6	7,21	137,34	93,47	3,09	233,90
8	7,15	95,77	113,85	3,44	213,05
10	6,94	49,07	154,08	3,69	206,85
12	7,25	5,39	188,57	5,32	199,28

2) 10 mg·L⁻¹ de oxitetraciclina

Tempo (h)	pH	N-NH ₄ ⁺ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N total (mg·L ⁻¹)
0	7,59	260,92	4,64	3,01	268,56
2	7,33	214,22	28,87	3,44	246,53
4	7,17	175,21	67,08	3,95	246,24
6	7,05	122,54	108,60	3,95	235,09
8	6,96	70,71	148,18	4,47	223,36
10	7,07	40,82	175,49	5,58	221,89
12	7,46	1,29	196,69	6,87	204,85

3) 50 mg·L⁻¹ de oxitetraciclina

Tempo (h)	pH	N-NH ₄ ⁺ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N total (mg·L ⁻¹)
0	7,6	241,56	4,79	3,01	249,35
2	7,38	225,90	22,41	2,75	251,05
4	7,28	194,57	44,19	3,44	242,20
6	7,18	148,73	79,63	3,95	232,31
8	7,16	108,30	104,25	4,38	216,93
10	7,05	77,83	136,73	4,81	219,38
12	7,15	38,65	159,03	5,93	203,61

4) 300 mg·L⁻¹ de oxitetraciclina

Tempo (h)	pH	N-NH ₄ ⁺ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N total (mg·L ⁻¹)
0	7,59	225,61	6,85	4,47	236,93
2	7,34	195,14	27,76	3,52	226,43
4	7,26	162,97	56,19	3,52	222,68
6	7,17	129,65	84,98	4,12	218,76
8	7,21	97,48	118,28	5,07	220,82
10	7,14	68,44	133,78	4,98	207,20
12	7,29	50,78	153,35	5,93	210,05

5) 600 mg·L⁻¹ de oxitetraciclina

Tempo (h)	pH	N-NH ₄ ⁺ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N total (mg·L ⁻¹)
0	7,57	202,83	7,00	4,72	214,56
2	7,35	178,34	24,62	2,66	205,63
4	7,29	147,31	56,19	3,78	207,27
6	7,23	123,11	84,98	4,04	212,12
8	7,32	98,62	91,33	4,38	194,33
10	7,42	80,11	113,11	4,04	197,26
12	7,57	65,59	125,29	4,55	195,43

- ENSAIOS REALIZADOS EM 11/12/2017:

1) Controle – vide Apêndice A

2) 1.200 mg·L⁻¹ de oxitetraciclina

Tempo (h)	pH	N-NH ₄ ⁺ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N total (mg·L ⁻¹)
0	7,64	187,56	8,71	3,26	199,53
2	7,38	160,22	25,30	3,78	189,30
4	7,3	144,85	46,38	4,21	195,44
6	7,38	126,05	66,06	4,21	196,32
8	7,58	115,42	74,49	5,32	195,24
10	7,69	99,19	85,74	5,41	190,34
12	7,82	92,35	92,06	7,56	191,97

3) 1.400 mg·L⁻¹ de oxitetraciclina

Tempo (h)	pH	N-NH ₄ ⁺ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N total (mg·L ⁻¹)
0	7,62	190,97	13,07	3,35	207,39
2	7,44	173,32	21,08	3,78	198,18
4	7,45	145,41	46,03	4,29	195,74
6	7,48	127,76	66,76	5,07	199,59
8	7,59	118,55	74,14	5,93	198,62
10	7,69	106,88	79,41	6,78	193,07
12	7,82	99,19	85,04	9,19	193,41

APÊNDICE D

Ensaio cinéticos para avaliação do efeito da oxitetraciclina sobre as bactérias nitrificantes

- ENSAIOS REALIZADOS EM 16/01/2018:

1) Controle

Tempo (h)	pH	N-NH ₄ ⁺ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N total (mg·L ⁻¹)
0	7,643	231,97	4,93	4,04	240,94
2	7,168	182,43	31,45	8,50	222,38
4	7,089	130,04	68,92	9,36	208,32
6	6,947	73,09	101,77	13,05	187,92
8	6,691	0,72	119,02	23,87	143,61
10	7,664	0,15	67,34	77,27	144,75
12	7,64	-0,04	22,22	127,74	149,93

2) 100 mg·L⁻¹ de oxitetraciclina

Tempo (h)	pH	N-NH ₄ ⁺ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N total (mg·L ⁻¹)
0	7,555	222,86	5,08	5,07	233,01
2	7,851	172,18	32,19	4,81	209,18
4	7,013	132,32	61,43	10,73	204,48
6	6,931	61,13	103,14	12,71	176,98
8	6,761	0,04	141,90	19,32	161,26
10	7,694	-0,07	95,39	60,61	155,92
12	7,751	-0,09	56,63	96,83	153,37

3) 500 mg·L⁻¹ de oxitetraciclina

Tempo (h)	pH	N-NH ₄ ⁺ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N total (mg·L ⁻¹)
0	7,571	194,96	10,10	4,64	209,70
2	7,263	164,78	38,47	5,32	208,57
4	7,253	115,80	62,17	6,61	184,58
6	7,12	62,27	100,19	8,33	170,79
8	6,88	12,34	161,10	8,84	182,28
10	7,54	3,80	127,14	41,72	172,66
12	7,661	0,38	99,08	51,17	150,63

4) 1.000 mg·L⁻¹ de oxitetraciclina

Tempo (h)	pH	N-NH ₄ ⁺ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N total (mg·L ⁻¹)
0	7,557	193,82	16,45	5,67	215,94
2	7,304	167,05	32,74	5,24	205,04
4	7,312	134,03	57,74	6,96	198,72
6	7,264	91,88	85,05	9,87	186,81
8	7,009	59,04	113,11	15,37	187,52
10	7,166	34,55	152,24	18,89	205,68
12	7,203	5,73	157,78	36,23	199,74

5) 1.500 mg·L⁻¹ de oxitetraciclina

Tempo (h)	pH	N-NH ₄ ⁺ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N total (mg·L ⁻¹)
0	7,548	188,13	15,56	5,75	209,44
2	7,242	166,49	31,45	6,18	204,12
4	7,261	120,93	56,26	8,33	185,52
6	7,169	87,33	82,47	14,68	184,48
8	7,045	60,18	106,83	23,78	190,79
10	7,176	36,37	121,23	38,12	195,72
12	7,387	11,20	148,92	43,44	203,56

6) 2.000 mg·L⁻¹ de oxitetraciclina

Tempo (h)	pH	N-NH ₄ ⁺ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg·L ⁻¹)	N total (mg·L ⁻¹)
0	7,589	189,26	8,33	3,44	201,03
2	7,359	168,19	23,52	4,72	196,43
4	7,355	139,15	40,39	9,02	188,55
6	7,316	115,80	68,81	11,85	196,46
8	7,175	92,64	81,36	21,20	195,21
10	7,173	64,17	105,36	28,33	197,85
12	7,219	33,41	134,52	30,65	198,58