



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO**

Instituto de Ciências Exatas e Biológicas- ICEB

Departamento de Ciências Biológicas- DECBI



**ANÁLISE DA PRESENÇA DE BACTÉRIAS RESISTENTES AO ANTIBIÓTICO  
TILOSINA EM CAMA DE AVIÁRIO SUBMETIDA A UM PRÉ-TRATAMENTO  
TÉRMICO E DIGESTÃO ANAERÓBIA**

**LETÍCIA DIAS NUNES COELHO**

**OURO PRETO - MG**

**2021**

LETÍCIA DIAS NUNES COELHO

**ANÁLISE DA PRESENÇA DE BACTÉRIAS RESISTENTES AO ANTIBIÓTICO  
TILOSINA EM CAMA DE AVIÁRIO SUBMETIDA A UM PRÉ-TRATAMENTO  
TÉRMICO E DIGESTÃO ANAERÓBIA**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Ouro Preto como requisito da disciplina Seminários de Pesquisa e Monografia II (CBI261) para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Ouro Preto.

**Área de concentração:** Ciências Biológicas

**Orientadora:** Prof. Dra. Silvana de Queiroz Silva

**Co-Orientadora:** Dra. Aline Gomes de Oliveira Paranhos

**OURO PRETO - MG**

**2021**

14/01/2022 15:00

SEI/UFOP - 0268488 - Folha de aprovação do TCC



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
REITORIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



FOLHA DE APROVAÇÃO

Leticia Dias Nunes Coelho

Análise da presença de bactérias resistentes ao antibiótico Tilosina em cama de aviário submetida a um pré-tratamento térmico e digestão anaeróbia

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas

Aprovada em 14 de Janeiro de 2022

Membros da banca

Dra. Silvana de Queiroz Silva - Orientadora - Universidade Federal de Ouro Preto  
Dra. Aline Gomes de Oliveira Paranhos - Co-orientadora - Universidade Federal de Ouro Preto  
Dra. Angélica Bianchini Sanchez - Universidade Federal de Ouro Preto  
Dra. Elyne Cristina Machado - Universidade Federal de Minas Gerais

Silvana de Queiroz Silva, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 14/01/2022



Documento assinado eletronicamente por Silvana de Queiroz Silva, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR, em 14/01/2022, às 14:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.739, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufop.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 0268488 e o código CRC F24CC045.

Referência: Caso responda este documento, indicar expressamente o Processo nº 23109.012283/2021-02

SEI nº 0268488

R. Diogo de Vasconcelos, 322, - Bairro Pilar Ouro Preto/MG, CEP 35400-000  
Telefone: 3135591672 - [www.ufop.br](http://www.ufop.br)

*Aos meus pais, Marconi e Carla, por todo apoio e suporte para que eu concluísse mais uma etapa em minha vida.*

*Aos meus irmãos, Rodrigo e Vanessa, pelo companheirismo sempre.*

*A minha tia, Neyde, pelo investimento e confiança a mim depositada.*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir a conclusão desse trabalho e de mais uma etapa em minha vida, por me dar forças e guiar meus passos.

Aos meus pais, Carlos Marconi e Carla, que sempre me apoiaram em todas as decisões, e contribuíram para que tudo isso acontecesse. Aos meus irmãos, Rodrigo e Vanessa, pela cumplicidade e carinho.

À Prof. Dra. Silvana de Queiroz Silva pela orientação, dedicação e confiança na elaboração desse trabalho.

A Dra. Aline Gomes de Oliveira Paranhos pela coorientação, pela dedicação, zelo e por me conceder tanto conhecimento,

À tia Neyde que me deu apoio e suporte para a conclusão do meu curso.

Ao Laboratório de Biologia e Tecnologia de Microrganismos, onde foi executado os experimentos pela paciência, cuidado e ensinamentos.

Ao Guilherme, por ser meu companheiro e incentivador dos meus sonhos.

À Universidade Federal de Ouro Preto pelo ensino de qualidade e a todos os seus servidores.

À CNPQ pela bolsa concedida, à FUNASA e CNPQ pelo suporte financeiro.

À república Moranguinho que me acolheu com tanto amor, pela amizade e por me ajudarem sempre que precisei.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho, meu sincero muito obrigada!

## RESUMO

O Brasil vem se destacando cada vez mais na produção e exportação de carne no mundo. Ele se tornou o principal país exportador de carne de frango. Para manter a produtividade e a competitividade no setor os produtores de aves investem cada vez mais na utilização de antibióticos como promotores de crescimento ou para fins terapêuticos. A Tilosina é um dos principais antibióticos utilizados como promotores de crescimento em frangos de corte e no combate à enterite necrótica e, na maioria das vezes, entra no meio ambiente via poluição difusa, pela aplicação da cama de aviário como fertilizante em áreas usadas pela agricultura. O principal problema em relação a essa prática de manejo é que a eventual presença de seletores de resistência (antibióticos, bactérias resistentes à antibióticos - BRAs e/ou genes de resistência à antibióticos - GRAs) no resíduo avícola, pode contribuir para o aumento da resistência em bactérias presentes no ambiente, via contaminação cruzada, colocando em risco a saúde humana e animal. Estudos prévios mostraram que o pré-tratamento térmico na cama de aviário a 80°C, potencializa a degradação anaeróbia desse resíduo, contribuindo assim para uma maior geração de biogás (Paranhos, 2021). Assim, buscou-se no presente trabalho, investigar o efeito do tratamento térmico da cama de aviário, seguido da digestão anaeróbia, na remoção de bactérias resistentes à Tilosina. De acordo com os resultados obtidos, o tratamento térmico da cama de aviário não se mostrou efetivo para remoção de bactérias resistentes à Tilosina em relação à bactérias totais, mantendo a proporção de bactérias resistentes semelhantes antes e após o tratamento (de 48% para 45%, respectivamente). No entanto, ao submeter a cama de aviário pré-tratada termicamente à digestão anaeróbia, remoções significativas na proporção de bactérias resistentes à Tilosina em relação à bactérias totais foram observadas, caindo para 11,4% em reator de dois estágios, e valores menores que 0,5% em reator de um estágio. Assim, pode-se considerar que a digestão anaeróbia de cama de aviário pré-tratada termicamente a 80°C é uma alternativa eficiente para reduzir os impactos causados pela disposição desse resíduo no meio ambiente e ainda gerar metano que pode ser utilizado como fonte de energia para o processo.

**Palavras-chave:** cama-de-aviário; pré-tratamento térmico; digestão anaeróbia; BRAs; Tilosina

## ABSTRACT

Brazil has been standing out more and more in the production and export of meat in the world. It has become the main exporting country of chicken meat. To maintain productivity and competitiveness in the sector, poultry producers are increasingly investing in the use of antibiotics as growth promoters or for therapeutic purposes. Tylosin is one of the main antibiotics used as growth promoters in broilers and in the fight against necrotic enteritis and, in most cases, it enters the environment via diffuse pollution, through the application of poultry litter as fertilizer in areas used by agriculture. . The main problem with this management practice is that the possible presence of resistance selectors (antibiotics, antibiotic resistant bacteria - ARBs and/or antibiotic resistance genes - GRAs) in the poultry residue can contribute to the increase in resistance in bacteria present in the environment, via cross-contamination, putting human and animal health at risk. Previous studies have shown that the pre-heat treatment in the poultry litter at 80 °C potentiates the anaerobic degradation of this residue, thus contributing to a greater generation of biogas (Paranhos, 2021). Thus, the present work sought to investigate the effect of heat treatment of poultry litter, followed by anaerobic digestion, on the removal of tylosin-resistant bacteria. According to the results obtained, the heat treatment of the poultry litter was not effective in removing tylosin-resistant bacteria in relation to total bacteria, keeping the proportion of resistant bacteria similar before and after treatment (from 48% to 45% , respectively). However, when subjecting the heat-treated poultry litter to anaerobic digestion, significant removals in the proportion of Tylosin-resistant bacteria in relation to total bacteria were observed, dropping to 11.4% in a two-stage reactor, and values lower than 0.5% in single stage reactor. Thus, it can be considered that the anaerobic digestion of thermally pre-treated poultry litter at 80°C is an efficient alternative to reduce the impacts caused by the disposal of this residue in the environment and generate methane that can be used as a source of energy for the process.

Keywords: poultry litter; heat pretreatment; anaerobic digestion; BRAs; Tylosin

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da Tilosina .....	17
Figura 2 - Fluxograma das origens das amostras.....	23
Figura 3 - Produção de metano a partir da cama de aviário com e sem pré-tratamento.....	28
Figura 4 - Imagens das placas de petri ilustrando o crescimento das colônias nos tratamentos CN, C80, C801S, C802S e IN. ....	30
Figura 5 - Quantificação de bactérias heterotróficas totais e bactérias resistentes à Tilosina nas amostras de cama de aviário submetidas à diferentes pré-tratamentos e inóculo (barras indicam desvio padrão).. ....	32
Figura 6 - Abundância relativa de isolados bacterianos resistentes ao antibiótico Tilosina em relação ao total de bactérias heterotróficas totais em CN, C80, C801S, C802S e IN. ....	322
Figura 7 – Imagem gel de agarose.....	36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção de metano a partir da cama de aviário com e sem pré-tratamento. ....	288
Tabela 2 - Diluição que proporcionou a contagem das bactérias em meio PCA .....	299
Tabela 3 - Efeito do uso do antibiótico Tilosina, desvio padrão na colonização por bactérias heterotróficas em cada um dos pré-tratamentos .....	31
Tabela 4 - Descrição da origem das colônias presentes na imagem do gel de agarose e resultado da coloração de Gram.....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
BHTs	Bactérias Heterotróficas Totais
BRAs	Bactérias resistentes a antibióticos
CN	Cama de aviário <i>in natura</i>
CA_1S	Cama de aviário <i>in natura</i> sob digestão anaeróbia em único estágio
CA_2S	Cama de aviário <i>in natura</i> sob digestão anaeróbia em duplo estágio
C80	Cama de aviário pré-tratada à 80°C
C801S	Amostra C80 submetida à digestão anaeróbia em único estágio;
C802S	Amostra C80 submetida à digestão anaeróbia em duplo estágio;
DP	Desvio Padrão
GLM	Modelo Linear Generalizado
GRAs	Genes de resistência a antibióticos
HCL	Ácido clorídrico
IN	Inóculo Metanogênico
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCA	Plate Count Ágar
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PTH80_1S	Cama de aviário pré-tratada termicamente a 80°C sob digestão anaeróbia em único estágio
PTH80_2S	Cama de aviário pré-tratada termicamente a 80°C sob digestão anaeróbia em duplo estágio
RLS	Razão Líquido Sólido
TIL	Tilosina
UASB	<i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i>
UE	União Europeia
UFC	Unidade Formadora de Colônias
V	Voltz

## SUMÁRIO

<b><u>1. INTRODUÇÃO</u></b> .....	<b>12</b>
<b><u>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u></b> .....	<b>15</b>
2.1 USO DE ANTIMICROBIANOS E RESISTÊNCIA .....	15
2.2 Tilosina .....	16
2.3 CAMA DE AVIÁRIO: PRINCIPAL RESÍDUO DA AVICULTURA .....	18
2.4 PROCESSO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA .....	19
<b><u>3. OBJETIVOS</u></b> .....	<b>21</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
4.1 AMOSTRAS .....	22
4.2 ENSAIO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA .....	23
4.3 CULTIVO DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS TOTAIS E BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS RESISTENTES À TILOSINA.....	24
4.4 QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS TOTAIS E BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS RESISTENTES À TILOSINA.....	24
4.5 IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS.....	25
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	27
<b><u>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</u></b> .....	<b>27</b>
5.1 PRODUÇÃO DE METANO A PARTIR DA DIGESTÃO ANAERÓBIA DE CAMA DE AVIÁRIO .....	27
5.2 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE BACTÉRIAS RESISTENTES A TILOSINA NAS AMOSTRAS SUBMETIDAS À DIGESTÃO ANAERÓBIA .....	29
5.3 IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS PRESENTES NO RESÍDUO DE AVICULTURA POR BIOLOGIA MOLECULAR .....	34
<b><u>6 CONCLUSÃO</u></b> .....	<b>37</b>
<b><u>7 REFERÊNCIAS</u></b> .....	<b>38</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil vem se destacando cada vez mais na produção e exportação de carne no mundo. Ele se tornou o principal país exportador de carne de frango e o quarto país na exportação de carne suína, além de ser o maior produtor de carne bovina (PARANHOS, 2021). Em 2017, o Brasil produziu mais de 13 milhões de toneladas de frango (DA CUNHA SILVEIRA; MONACO VIEIRA, 2020). Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal, ABPA (2021), até julho de 2021 foram exportadas 424,4 mil toneladas de frango, número este 16,4% maior ao alcançado no mesmo período de 2020. Este cenário mostra que vem ocorrendo uma mudança de hábito na cultura brasileira, na qual a população passou de grande consumidora de carne bovina para consumidora de carne de frango, majoritariamente (PARANHOS, 2021).

A fim de garantir a qualidade e manter a concorrência elevada no mercado interno e externo, os produtores de aves investem cada vez mais em medicamentos veterinários, que são utilizados no tratamento, controle e prevenção de doenças, assim como para a promoção do crescimento de animais produtores de alimentos (ANVISA, 2019).

Dentre esses medicamentos veterinários estão os chamados fármacos antimicrobianos, que são substâncias capazes de diminuir ou eliminar organismos patogênicos seja para prevenção ou tratamento de infecções (MELO; DUARTE; SOARES, 2012), ou ainda como promotor de crescimento. Atualmente, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) autoriza o uso de 12 compostos antimicrobianos como aditivos na alimentação animal e outros 50 para fins terapêuticos, muitos dos quais de uso comum para diversas espécies animais, como bovinos, suínos e aves (PALERMO-NETO et al., 2006; MAPA, 2018).

O grande problema da ocorrência desses antibióticos é que muitos deles não são metabolizados no organismo animal, sendo eliminados na excreta. Uma das principais vias de contaminação desses compostos no solo é a utilização desses resíduos para fins de adubação (REGITANO; MARQUES; LEAL, 2010). No ambiente esses compostos contaminam o solo, águas subterrâneas e corpos hídricos. Além disso os resíduos descartados no solo se acumulam em tecidos vegetais, o que resulta em maior risco à saúde humana (REGITANO; MARQUES; LEAL, 2010).

A exposição frequente e o consumo inadequado desses antibióticos na avicultura causam o desenvolvimento de superbactérias, capazes de resistir aos antibióticos utilizados no tratamento de doenças. O aumento das bactérias resistentes a antibióticos ocorre, dentre outras causas, devido à pressão seletiva exercida pelas baixas concentrações desses agentes durante o tratamento dos animais (ANVISA, 2019). Tal resistência gera algumas consequências para toda

a população, como o aumento da taxa de mortalidade de doenças provenientes de bactérias em consequência do maior desenvolvimento delas (ANVISA, 2019), além de tornar os antibióticos mais caros e restringir a disponibilidade de medicamentos em países de baixa e média renda (VAN BOECKEL et al., 2014).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) está se mobilizando cada vez mais para encontrar alternativas contra a resistência antimicrobiana. Bactérias resistentes a antibióticos (BRAs) e genes de resistência a antibióticos (GRAs) foram considerados umas das maiores ameaças à saúde pública global. De acordo com dados da ANVISA (2019), estima-se que até 2050 o problema causará, anualmente, a perda de 10 milhões de vidas em todo o mundo, além de um prejuízo econômico de 100 trilhões de dólares. Isso se dá principalmente porque muitos dos antimicrobianos utilizados na criação animal pertencem as mesmas classes usadas no tratamento de doenças humanas (DIAS, 2018).

Sabe-se muito pouco sobre o comportamento dos possíveis impactos ambientais resultantes da presença de resíduos de antibióticos provenientes do uso veterinário em empresas de produção animal (REGITANO; MARQUES; LEAL, 2010). A identificação de BRAs presentes nos resíduos gerados pela avicultura, como a cama de aviário, permite o melhor gerenciamento desse resíduo e a consequente adoção de técnicas capazes de minimizar a presença desses agentes, anteriores à disposição deste material como biofertilizante no meio ambiente. A consequente falta de ações afim de mitigarem os impactos causados pelo não gerenciamento correto desses resíduos pode prejudicar tanto o meio ambiente como a saúde pública. (DA CUNHA SILVEIRA; MONACO VIEIRA, 2020).

A partir dos problemas de microrganismos patogênicos, da contaminação do solo e dos recursos hídricos usados na produção avícola, torna-se necessário desenvolver medidas para minimizar esses impactos e os riscos ao meio ambiente. Segundo HAHN (2004) esta preocupação é crescente devido ao atual modelo de produção de aves que continua aumentando a produção e disponibilidade destes resíduos.

Um dos principais antibióticos utilizados como promotores de crescimento e combate a doenças em avicultura é a Tilosina (de fórmula química  $C_{46}H_{77}NO_{17}$ ), a qual possui grande similaridade química com o antibiótico de uso humano eritromicina ( $C_{37}H_{67}NO_{13}$ ). (PARANHOS, 2021). Assim, considerando essa similaridade estrutural pode-se inferir que a presença de Tilosina no ambiente, devido ao reuso agrícola dos resíduos da avicultura, possa estimular o desenvolvimento de resistência não apenas à ela mas também à Eritromicina, comprometendo o controle de infecções bacterianas em aves e nos humanos.

Uma possível alternativa para reduzir o impacto causado pelo lançamento de Tilosina no ambiente é promover o tratamento da cama de aviário, a fim de reduzir e eliminar os patógenos e resíduos de substâncias químicas (HAHN, 2004). Diversos estudos já mostraram a potencial aplicação da cama de aviário *in natura* em sistemas anaeróbios (COSTA et al., 2012; MIAH et al., 2016; RAJAGOPAL & MASSÉ, 2016; SHEN & ZHU, 2017), e outros, inclusive, mostraram os efeitos do tratamento anaeróbio na redução de bactérias (BRAs) e genes (GRAs) de resistência a antibióticos em resíduos agropecuários (ANJUM, GROHMANN & KRAKAT, 2017; LUO et al., 2017). Entretanto, o efeito do pré-tratamento térmico aplicado ao resíduo cama de aviário na redução de seletores de resistência antimicrobiana (antibióticos, BRAs e GRAs) e na potencialização da produção de biogás a partir desse resíduo em sistemas biológicos de tratamento ainda não foi estudado. Assim, a proposta apresentada neste trabalho envolve a avaliação do papel do tratamento do resíduo de cama de aviário por digestão anaeróbia na remoção de bactérias resistentes à Tilosina.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. USO DE ANTIMICROBIANOS E RESISTÊNCIA

O uso de antimicrobianos no combate às doenças causadas por bactérias e como promotores de crescimento foram revolucionárias nos últimos anos. Segundo a EMBRAPA (2004), o seu uso aumentou muito a produção animal e a taxa de crescimento dos animais, melhorou a utilização dos alimentos, diminuiu o tempo de engorda e reduziu a mortalidade pela diminuição da ocorrência de doenças. O grande problema vinculado a isso é que a utilização desses antimicrobianos provocaram um cenário de resistência, o que tem gerado uma crescente preocupação (MACHADO et al., 2020). Segundo (LIMA; BENJAMIM; SANTOS, 2017) a classe dos antibióticos está na lista de medicamentos mais prescritos no mundo. Apesar da importância da produção de animal para o país, a ocorrência de antibióticos veterinários no ambiente e os riscos à saúde humana é um fator preocupante e que carece de pesquisas na área (REGITANO; MARQUES; LEAL, 2010).

A resistência bacteriana caracteriza-se pela capacidade de um microrganismo de resistir a ação de um fármaco. Ela também pode ser uma adaptação genética da bactéria, que através de alguns mecanismos bioquímicos impedem os efeitos dos antibióticos (DIAS, 2018).

A resistência de bactérias aos antimicrobianos se apresentam como uma ameaça à saúde pública, devido ao seu impacto no tratamento de doenças humanas (DIAS, 2018). Ela leva ao desenvolvimento de super bactérias, causa o aumento da taxa de mortalidade de doenças provenientes de bactérias, torna os antibióticos mais caros além de restringir a disponibilidade de medicamentos em países de baixa e média renda.

As bactérias desenvolvem resistência de várias maneiras, por meio de mecanismos intrínsecos e mecanismos adquiridos (EMBRAPA, 2004). Os mecanismos de ação intrínsecos, podem ocorrer quando as bactérias sofrem mutações promovendo, por exemplo, modificações enzimáticas ou estruturais que proporcionam resistência aos antibióticos, inutilizando-os (LIMA; BENJAMIM; SANTOS, 2017). Nesse caso pode ocorrer transmissão da resistência verticalmente de geração em geração. Os mecanismos de ações adquiridos ocorrem por meio de aquisições genéticas, (LIMA; BENJAMIM; SANTOS, 2017) ocorrendo a incorporação de genes externos que conferem resistência a antibióticos (DIAS, 2018). A resistência bacteriana adquirida ocorre por meio de mecanismos de transdução, transformação e conjugação. A conjugação e transdução envolve a transferência de material genético através de plasmídeos e vírus, respectivamente, enquanto a transformação ocorre pela entrada de fragmentos de DNA no interior da célula (ALTERTHUM, F).

## 2.2 Tilosina

A Tilosina ( $C_{46}H_{77}NO_{17}$ ) é um antibiótico pertencente ao grupo de antibióticos macrolídeos, produzida por microrganismos da espécie *Streptomyces fradiae*. A produção de Tilosina por uma espécie ocorrente em solos, sugere que os microrganismos ambientais podem ter desenvolvidos mecanismos de resistência intrínsecos. No entanto a presença de elevadas concentrações de Tilosina no ambiente como pressão seletiva pode favorecer a incorporação de material genético por espécies não resistentes.

A formulação comercial da Tilosina é constituída de uma mistura de quatro antibióticos macrolídeos, porém seu principal componente da mistura é a Tilosina A (PARANHOS, 2021).

Os macrolídeos são antibióticos que caracterizam por conter em sua estrutura um anel macrocíclico de lactona, contendo 14, 15 ou 16 átomos de carbono. Esse grupo de antibióticos se liga a receptores da subunidade 50S do ribossomo das bactérias promovendo a inibição da síntese proteica (DA SILVA FILHO; PINTO; STEIN, 2015). Os macrolídeos apresentam geralmente efeito bacteriostático, que segundo HAUSER (2009) inibem o crescimento das bactérias no meio, sendo necessária atuação externa para eliminação das mesmas, tarefa do sistema imunológico na presença de organismos infecciosos no corpo humano. Quando usados em elevadas concentrações apresentam efeito bactericida, e apresentam ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (COSTA, 2014).

Os antibióticos macrolídeos constituem a segunda classe de antibióticos de uso veterinário mais usados, sendo a Tilosina exclusivamente usada para esse fim (COSTA, 2014). A Tilosina é considerada uma substância análoga aos macrolídeos de uso humano. Considerada uma base fraca ( $pK_a$  7,73) a Tilosina sofre degradação em condições ácidas (COSTA, 2014), formando sais e ésteres rapidamente (PARANHOS, 2021).

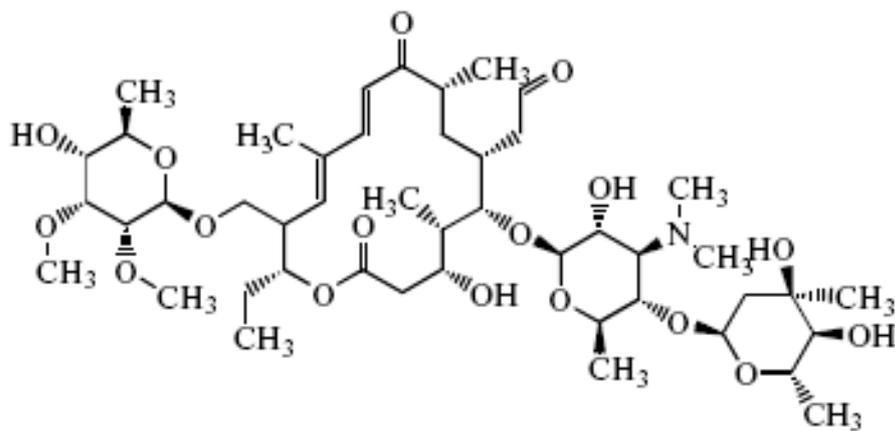
No Brasil os macrolídeos estão disponíveis para o tratamento de diversas infecções bacterianas, agudas e crônicas nos animais (COSTA, 2014). A Tilosina também pode ser utilizada como promotora de crescimento nos animais (COSTA et al., 2015).

O emprego dos antimicrobianos a pecuária varia conforme a legislação de cada país. A União Européia (UE) proibiu o uso da Tilosina como promotora de crescimento após estudos concluírem que o uso prolongado dessa substância seleciona microrganismos resistentes e transferência de genes de resistência (GRAs) para o homem. Esse antibiótico também pode causar efeitos indesejáveis para a saúde humana, uma vez que ele não é totalmente metabolizado no organismo e pode ficar resíduos do mesmo nos tecidos dos animais produtores de alimentos, contribuindo para o aparecimento de alergias em humanos com

hipersensibilidade. Sua exposição prolongada também pode levar a efeitos citotóxicos, genotóxicos e desordens reprodutivas (COSTA, 2014).

A capacidade de transmissão destes microrganismos resistentes para os seres humanos através da ingestão de produtos contaminados possui alto impacto na ação dos antimicrobianos importantes para a medicina humana, comprometendo no tratamento de diversas doenças humanas através da perda da eficácia de diversos antibióticos, porque muitos antimicrobianos utilizados em animais pertencem a mesma classe de antibióticos de uso humano (DIAS, 2018), como a resistência a Tilosina que é semelhante à do antibiótico de uso humano eritromicina, o que pode haver resistência cruzada entre elas, essa resistência acontece por alteração do sítio receptor dos ribossomos (PARANHOS, 2021), local alvo dos referidos antibióticos.

O desenvolvimento de bactérias resistentes a antibióticos é uma das principais preocupações em relação ao uso da Tilosina. Em 2018, segundo a Portaria SDA/MAPA nº 171, de 13 de dezembro de 2018, foi proibido nacionalmente o uso da Tilosina e de outros antimicrobianos promotores de crescimentos em animais, porém a Tilosina ainda tem seu uso permitido para fins terapêuticos (PARANHOS,2021).



**Figura 1.** Estrutura química da Tilosina. Fonte: (COSTA et al., 2015)

### 2.3 CAMA DE AVIÁRIO: PRINCIPAL RESÍDUO DA AVICULTURA

A cama de frango ou cama de aviário se apresenta como principal resíduo gerado na produção de aves. A cama de aviário é um substrato utilizado para proteger as aves e promover o isolamento do piso do aviário (DA CUNHA SILVEIRA; MONACO VIEIRA, 2020). Ela também contribui para a redução das mudanças de temperatura no aviário, além de incorporar urina e fezes e servir de substrato para absorção de água (AVILA et al., 2008). Ela é composta por matéria orgânica particulada e dissolvida podendo ser penas de aves, ração, maravalha, casca de amendoim, casca de arroz, casca de café, capim seco, sabugo de milho entre outros (BRUINSMA, 2015).

Durante muito tempo a cama de aviário foi utilizada como ingrediente de ração para ruminantes, devido ao seu alto conteúdo nutricional, porém em 2001, por meio da portaria DOU de 17 de Julho de 2001, foi proibida a comercialização e uso da cama de aviário para esta finalidade, devido a possibilidade de ocorrência da “doença da vaca louca” – Encefalopatia Espongiforme Bovina (EBB) – nos bovinos e até mesmo no homem, afetando o sistema nervoso central, causando mudança no comportamento, paralisia e morte (HAHN, 2004).

Atualmente, a cama de aviário é utilizada como fertilizante orgânico por conter uma carga de nutrientes muito grande como nitrogênio, fósforo e potássio. Porém, o alto conteúdo orgânico dessa cama leva a emissões não controladas de gás estufa, além de que a aplicação da cama de aviário na agricultura pode resultar em um enriquecimento de nutrientes no solo e na água, levando a uma eutrofização dos cursos d`água, contaminação do lençol freático, além de conter microrganismos patogênicos.

Os antimicrobianos chegam ao meio ambiente por diversas rotas, podendo ser através de esgoto doméstico e hospitalar, sendo esses efluentes das ETEs uma das principais fontes de disseminação dos antibióticos (MACHADO et al., 2020); ou por meio do escoamento superficial, quando esterco animais são aplicados em solos como fertilizantes. A cama de aviário também pode ser via de contaminação de resíduos de antibióticos veterinários utilizados na criação desses animais (PARANHOS, 2021).

A utilização da cama de aviário para fins de adubação consiste em uma das vias de contaminação, pois muitos antibióticos não são metabolizados no organismo do animal sendo excretados na urina e nas fezes (REGITANO; MARQUES; LEAL, 2010). Foram detectados resíduos de diversos fármacos em amostras de solo. No solo esses fármacos podem ser absorvidos e acumulados nos tecidos vegetais, resultando em riscos à saúde humana quando há colheita e consumo desses vegetais (REGITANO; MARQUES; LEAL, 2010). Assim, algumas

bactérias podem colonizar nosso trato gastrointestinal, através da contaminação por fezes desses animais ou pelo consumo de produtos de origem animal contaminados (DIAS, 2018).

Alguns autores reportaram concentrações de Tilosina no meio ambiente. Ok et al. (2011) observou a concentração desse antibiótico na água e a faixa de ocorrência dessa substância era de 0,23 – 2,19  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Ele também observou a concentração do antibiótico em amostras de sedimento e solo e a concentração era de 12,32 – 13,38 e, 84,47 - 222,84  $\mu\text{g.L}^{-1}$  respectivamente.

Há uma grande preocupação com o gerenciamento correto desses dejetos e também de efluentes sanitários devido a necessidade de controlar os microrganismos patogênicos e genes de resistência pois seu uso inadequado afeta a saúde e o meio ambiente (DIAS, 2018). Portanto, uma possível alternativa para diminuir os impactos causados pela cama de aviário bruta no meio ambiente é a utilização desse resíduo como matéria prima para produzir biogás. Essa alternativa é vantajosa pois o metano produzido pode ser utilizado como fonte de energia, na substituição de combustíveis fósseis, agregando valor à produção e diminuindo a emissão de dióxido de carbono. Além de reduzir microrganismos patogênicos que podem causar doenças, esse processo diminui odores e os gases e efluentes são controlados. (JÚNIOR, 2010).

#### 2.4 PROCESSO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA

A digestão anaeróbia é um sistema de tratamento que ocorre em condições anaeróbias na qual diferentes tipos de organismos promovem a transformação da matéria orgânica, degradando-a até a forma de metano ( $\text{CH}_4$ ) e dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) (STEIL, 2001). Este processo ocorre em quatro fases, sendo elas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. A geração do biogás ocorre na última etapa do processo. (ARAÚJO, 2017).

Na hidrólise se inicia o processo de digestão anaeróbia. Este ocorre devido à quebra de polímeros ou materiais particulados em compostos menores como ácidos graxos, aminoácidos e açúcares. Após a hidrólise ocorre a acidogênese em que bactérias fermentativas transformam no interior de suas células os produtos da hidrólise em ácidos graxos voláteis, álcoois, ácido láctico, hidrogênio e gás carbônico (ALVES; ZANATO, 2014). Nesta fase a concentração de hidrogênio influencia na eficiência da acidogênese, pois quando a sua concentração é elevada ocorre o consumo de ácidos orgânicos, que podem influenciar no pH do processo (ARAÚJO, 2017). Segundo STEIL (2001) as bactérias envolvidas na acidogênese são em sua maioria anaeróbias estritas, mas cerca de 1% consiste em bactérias facultativas (ALVES; ZANATO, 2014). Na próxima fase que é a acetogênese as bactérias acetogênicas transformam os produtos gerados na acidogênese em ácido etanóico, hidrogênio e gás carbônico. Estes produtos serão

consumidos por dois grupos de arqueias metanogênicas durante a metanogênese, sendo esses grupos as metanogênicas hidrogenotróficas que utilizam hidrogênio e dióxido de carbono, e as metanogênicas acetoclásticas que utilizam o ácido acético e metanol (MULLER, 2019).

Como a digestão anaeróbia se dá através de reações bioquímicas realizadas por milhares de bactérias, as condições operacionais do processo devem ser ideais para o produto almejado, como o tipo de substrato, as características dos biodigestores e o meio nutriente ideal para se obter a melhor eficiência da digestão anaeróbia (ARAÚJO, 2017).

Atualmente o processo de digestão anaeróbia é utilizado para o tratamento de uma grande variedade de resíduos orgânicos gerados pela ação antrópica (STEIL, 2001). Para os produtores, a digestão anaeróbia desses resíduos orgânicos é, muitas vezes, viável economicamente, pois tem a produção de biogás que é uma energia limpa, renovável e que pode ser reaproveitada em galpões como substituto da lenha, por exemplo; e de biofertilizante, que pode ser diretamente aproveitado na agricultura (ALVES; ZANATO, 2014). Este processo também tem como vantagem destruir organismos patogênicos e parasitas (NASCIMENTO, 2011).

Segundo MONIQUE et al. (2017), o biogás é denominado como o produto obtido através da decomposição anaeróbia da matéria orgânica. Sua produção é proveniente de um meio com condições químicas e físicas, como determinadas faixas de temperatura, de pH e relação carbono/nitrogênio da biomassa adequadas dentro de um biodigestor, “no qual as bactérias hidrolíticas, acidogênicas e acetogênicas degradam a matéria orgânica produzindo acetato, e este é utilizado pelas arqueias metanogênicas para a produção de metano” (ARAÚJO, 2017). Dessa forma, em condições favoráveis, o metano é o principal componente do biogás, representando cerca de 60-80% desse gás (ALVES; ZANATO, 2014). Uma das vantagens do biogás é que ele pode ser usado como fonte de energia através da decomposição ou degradação anaeróbia de dejetos causadores de poluição, “trazendo benefícios econômicos e para o meio ambiente para quem produz, através da geração de eletricidade e calor” (ALVES; ZANATO, 2014). Além disso, o biocomposto, ou, resíduo final da digestão anaeróbia é rico em nutrientes e após extração do metano e outros subprodutos, este pode ser utilizado com biofertilizante.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a ocorrência de bactérias resistentes ao antibiótico Tilosina em resíduos provenientes de empresa de frango de corte e tratados por digestão anaeróbia (sob condições previamente otimizadas) em único e duplo estágio visando a produção de biogás.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Quantificar colônias de bactérias heterotróficas totais na presença e ausência do antibiótico Tilosina;
- Comparar a proporção de bactérias heterotróficas resistentes a Tilosina na cama de aviário bruta e após os tratamentos;
- Isolar e identificar bactérias resistentes à Tilosina por meio do sequenciamento do gene RNAr 16S.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

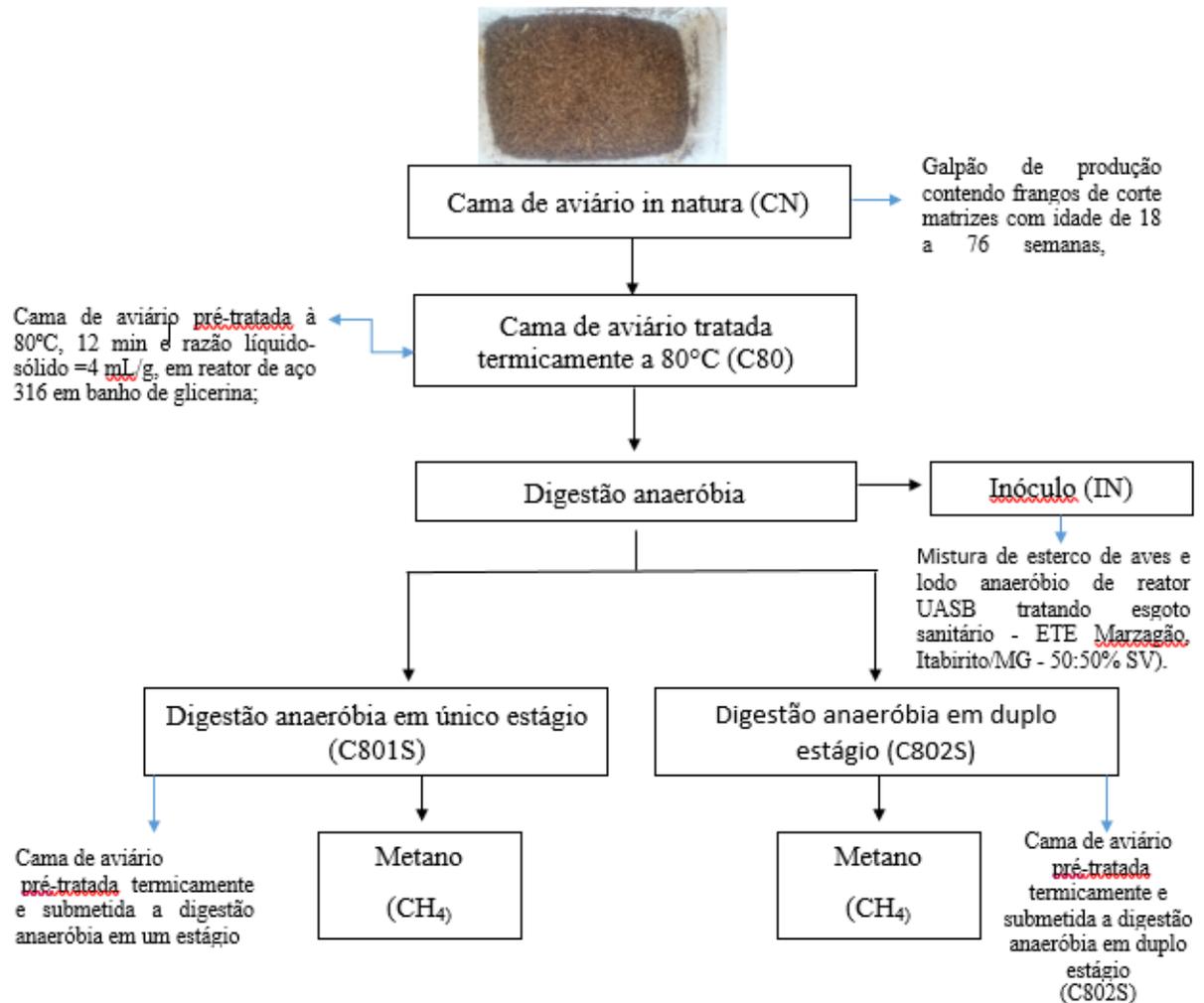
### 4.1 AMOSTRAS

A amostra de cama de aviário *in natura* foi gentilmente cedida por uma empresa produtora de frangos de corte localizada em Minas Gerais. As outras amostras utilizadas para o desenvolvimento desse projeto, geradas a partir do tratamento térmico e da digestão anaeróbia, foram obtidas pela aluna do grupo de pesquisa responsável pelo projeto “Efeito da digestão anaeróbia em dois estágios do potencial metanogênico de diferentes resíduos provenientes de empresa avícola” (PIBIC/PIBIC-AF/CNPq/UFOP 2020-2021). As amostras foram armazenadas em frascos de prolipropileno (PP), identificadas e transportadas ao Laboratório de Biologia e Tecnologia de Microorganismos (LBTM) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), onde as técnicas microbiológicas foram aplicadas.

As amostras foram denominadas como sendo:

1. (CN) Cama de aviário *in natura* coletada no galpão de produção contendo frangos de corte matrizes com idade de 18 a 76 semanas, e com Tilosina na concentração de  $265 \mu\text{g.kg}^{-1}$  (PARANHOS ET AL., 2020).
2. (IN) Inóculo metanogênico (mistura de esterco de aves e lodo anaeróbio de reator UASB tratando esgoto sanitário - ETE Marzagão, Itabirito/MG - 50:50% SV), utilizado nos ensaios de digestão anaeróbia.
3. (C80) Cama de aviário pré-tratada à  $80^{\circ}\text{C}$ , 12 min e razão líquido-sólido (RLS)=4 mL/g, em reator de aço 316 em banho de glicerina;
4. (C801S) Amostra C80 submetida à digestão anaeróbia em único estágio;
5. (C802S) Amostra C80 submetida à digestão anaeróbia em duplo estágio;

Na figura 2 é indicado através de um fluxograma a origem de cada amostra.



**Figura 2.** Fluxograma das origens das amostras Fonte: O autor (2021)

## 4.2 ENSAIO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA

Os experimentos de digestão anaeróbia em fase sólida em único estágio (DA\_1S) da cama de aviário *in natura* e pré-tratadas a 80°C foram realizados pela Aline Paranhos (Paranhos et al. 2021) e seguiram a seguinte metodologia: foram utilizados frascos de vidro de 120 mL, no qual 50% do volume foi destinado ao headspace e o restante ao volume útil. Os frascos foram igualmente preenchidos com o substrato (cama de aviário) e inóculo (lodo anaeróbio de estação de tratamento de esgotos) de forma a manter a relação alimento/microrganismo (A/M) de 0,5 gSV. O pH foi ajustado em aproximadamente 9,0 com NaOH (1,0 M).

A digestão anaeróbia em duplo estágio (DA\_2S) consistiu na separação espacial do estágio acidogênico do estágio metanogênico, utilizando dois frascos isoladamente. Os frascos também foram preenchidos com substrato e inóculo (A/M = 0,5 gSV.gSV<sup>-1</sup>), e o pH foi

acertado em aproximadamente 5,5 utilizando HCl (1,0 M). A partir do momento em que a fase acidogênica se estabilizou (variação menor que 5% na produção), adicionou-se o inóculo utilizado nos experimentos de DA\_1S e elevou-se o pH para aproximadamente 9,0. Para cada condição, gás N<sub>2</sub> foi purgado de forma a manter a anaerobiose do sistema. Os frascos foram incubados em incubadora shaker (Thoth, modelo 6440) e mantidos sob temperatura e agitação constantes (35°C e 180 rpm).

#### 4.3 CULTIVO DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS TOTAIS E BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS RESISTENTES À TILOSINA

Para promover o crescimento e isolamento de bactérias heterotróficas resistentes e não resistentes à Tilosina utilizou-se o meio Plate Count Agar (PCA/KAsvi), suplementado ou não com o antibiótico Tilosina na concentração de 10 mg/L. Esse antibiótico foi escolhido em função da sua utilização na avicultura de corte.

As cinco amostras sofreram diluições seriadas em tubos de ensaio. Inicialmente foram pesadas 0,200 gramas de cada amostra e diluída em 1mL de água destilada estéril e a partir desta solução foi pego 100 uL das amostras e colocadas em tubos contendo 900uL de água realizando diluições na ordem de de 10<sup>1</sup> a 10<sup>5</sup> vezes.

Foram inoculados 50uL de cada amostra diluída nos meios PCA e distribuídas com o auxílio de pérolas de vidro estéreis, pelo método de *spread plate*. Após inoculação as placas foram incubadas na estufa por 27°C por 24 horas e depois a 37°C por 24 horas. As amostras CN, C80, C801S e C802S foram analisadas em triplicata. A amostra de IN foi analisada em duplicata. As placas cuja diluição da amostra permitisse a contagem de colônias, entre 30 e 300, foram escolhidas para representar o experimento e estão apresentadas na Tabela 1.

#### 4.4 QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS TOTAIS E BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS RESISTENTES À TILOSINA

As colônias crescidas em cada amostra, com suas respectivas triplicatas, foram analisadas e as colônias foram contadas. Posteriormente o número de colônias obtido nas diferentes amostras e nos dois diferentes meios, com Tilosina e sem Tilosina, foram corrigidos considerando o volume aplicado ao meio bem como pelo fator de diluição utilizado, e o resultado foi expresso em unidades formadoras de colônias (UFC/mL).

Empregou-se o software Microsoft Office Excel 2016© (Copyright Microsoft Corporation 2016) para a construção dos gráficos apresentados nas figuras 3, 5, 6 e 7.

Após a contagem dos isolados de BHTs e BRAs, algumas colônias de bactérias resistentes à Tilosina foram selecionadas para realizar a extração de DNA e identificação. O critério utilizado para seleção das colônias foi escolher uma colônia que representasse os diferentes morfotipos presentes nos cultivos, considerando a forma, a textura e a cor das diferentes colônias. As colônias selecionadas foram repicadas no mesmo meio de cultivo e incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente. Foram preparados os estoques em meio líquido caldo nutriente acrescido de glicerol 20% como criopreservante. Os isolados foram mantidos em freezer a -20°C. Essas mesmas colônias de bactérias resistentes à Tilosina que foram re-isoladas também foram submetidas a coloração diferencial de Gram.

#### 4.5 IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS

Para identificação das bactérias inicialmente foi realizada a coloração diferencial de Gram, técnica que permite a distinção de grupos bacterianos, baseados na habilidade dos mesmos em reter certos corantes. A técnica de coloração diferencial de Gram foi realizada segundo o protocolo do livro de Microbiologia Geral de Alterthum,F.

Foram escolhidas colônias que representassem os diferentes morfotipos presentes nos cultivos. Sendo assim, foram selecionadas colônias de formato arredondado, oval, e algumas que se apresentavam com formatos indefinidos. Outro critério considerado para a seleção das colônias foram as cores em que estas se apresentavam, sendo algumas de coloração brancas, amareladas, transparentes, laranjas e leitosas.

Com o auxílio de uma alça de repicagem estéril foi coletado uma gota dos microrganismos presentes em meio líquido caldo nutriente acrescido de glicerol 20%. Foi realizado um esfregaço com movimentos circulares espalhando toda a suspensão microbiana de modo que formasse uma camada fina e uniforme na área central da lâmina. O esfregaço foi fixado passando de três a seis vezes sobre a lâmina do bico de Bunsen e em seguida foi deixado esfriar. Após realizado esta técnica o esfregaço foi coberto com corante cristal violeta por 1 minuto para colorir as células bacterianas de roxo escuro. Depois a lâmina foi lavada e o esfregaço foi coberto com a solução de lugol por mais 1 minuto. Este tem a função de aumentar a interação entre a célula bacteriana com o primeiro corante. Novamente a lâmina foi lavada e coberta com solução de safranina por 30 segundos. Após esses procedimentos as lâminas foram

observadas em um microscópio óptico com objetiva de imersão de 100 vezes de alta luminosidade, focalizando inicialmente com as objetivas de menor aumento.

O DNA total das bactérias isoladas (BRAs) foi extraído segundo o protocolo de (MACHADO et al., 2020) modificado. Foi realizada a amplificação do DNAr 16S pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Foram utilizados os primers 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) e 1492R (ACCTTGTTACGACTT) (MACHADO, 2013).

Colônias individuais foram extraídas das placas com meio de cultivo Plate Count Ágar contendo as BRAs com o auxílio de uma alça de inoculação estéril e colocadas em tubos acrescentados de 100  $\mu$ L de solução tampão TE (100 mM Tris/HCl, 1mM EDTA, pH 8). As culturas foram centrifugadas a 8.000 g por 2 minutos, descartando-se o sobrenadante e obtendo-se um precipitado, o qual foi ressuscitado em 400  $\mu$ L de tampão de extração (100mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, 1mM EDTA, pH 8). Após isso as culturas foram centrifugadas novamente a 8.000 g por 2 minutos e o pellet foi ressuscitado em 200  $\mu$ L de tampão TE. Foi adicionado 100 $\mu$ L de fenol TE-saturado nos tubos e misturado no vórtex por 60 segundos. Depois as amostras foram centrifugadas a 1.300 g durante 5 minutos a 4°C, a fim de separar a fase aquosa da fase orgânica. A fase aquosa superior foi transferida para um tubo de 1,5 mL e adicionado 40 $\mu$ L de tampão TE para se obter 200  $\mu$ L. Após isso foi misturada com 100  $\mu$ L de clorofórmio e centrifugada a 13.000g a 4°C durante 5 minutos. Após esse procedimento a fase aquosa superior foi transferida para um tubo limpo de 1,5ml e adicionado 40  $\mu$ L de tampão TE. Depois as amostras foram levadas para o termociclador para amplificar uma sequência do DNA das amostras. As reações de amplificação foram efetuadas em 25  $\mu$ L de solução contendo os seguintes reagentes: 16,37 $\mu$ L de água ultrapura 2,5  $\mu$ L Buf/Mg, 0,5 $\mu$ L de dNTP, 1,5  $\mu$ L de DNA e 2 $\mu$ L de cada primer. As condições do termociclador eram desnaturação a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 60 segundos, e por fim extensão final de 5 minutos a 72°C (MACHADO et al., 2020).

Para verificar a qualidade do DNA extraído foi realizado eletroforese em gel de agarose. A esse gel foi aplicada 1  $\mu$ L de corante azul de bromofenol para cada 10  $\mu$ L de solução de gel. Utilizou-se como padrão de comparação marcador 1kb DNA Ladder (250pb até 10.000pb), nas concentrações de 100 e 200 ng/mL. Após 25 minutos em eletroforese a 100 V, o gel foi tratado com SYBR Safe™ DNA Gel Stain (Invitrogen Corporation), conforme instrução do fabricante, e visualizado em um aparelho transluminador com luz UV.

## 4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para avaliar a normalidade dos dados foi utilizado o teste de Shapiro Wilk. Para analisar o efeito do pré-tratamento e da digestão anaeróbia na cama de aviário quanto à diminuição da abundância de unidades formadoras de colônias (UFC's) de bactérias, foi criado um modelo linear generalizado (GLM). A variável resposta foi o número de UFC/g e a variável explicativa foi a origem das amostras (C802S, C801S, C80, IN e o CN).

Para avaliar separadamente o efeito do uso do antibiótico Tilosina na diminuição da abundância de unidades formadoras de colônias (UFC's) de bactérias, de cada amostra, foram gerados outros cinco GLM's. Em cada um deles a variável resposta foi o número de UFC/mL e a variável explicativa foi o uso de antibiótico (Com ou Sem). Foram gerados cinco gráficos em que são comparadas as médias de UFCs em meio com e sem antibiótico para cada tratamento. Os resultados também foram expressos de forma relativa, onde calculou-se a proporção de BRA em relação a BHT.

Após a construção dos gráficos foram avaliadas se houve diferenças estatísticas entre os dados apresentados. Para determinar a diferença entre as categorias foi realizada uma análise de contraste (CRAWLEY, 2013). Em todos os testes foram considerados significativos os valores de  $p < 0,05$ . Todas essas análises foram realizadas no software R (R Development Core Team 2021).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PRODUÇÃO DE METANO A PARTIR DA DIGESTÃO ANAERÓBIA DE CAMA DE AVIÁRIO

Os ensaios de digestão anaeróbia para produção de metano foram realizados por PARANHOS (2021), em que a cama de aviário foi avaliada sob diferentes condições, a saber, a cama de aviário *in natura* sob digestão anaeróbia em único estágio (CA\_1S) e duplo estágio (CA\_2S); e cama de aviário pré-tratada termicamente a 80°C sob digestão anaeróbia em único estágio (PTH80\_1S) e duplo estágio (PTH80\_2S). Os resultados estão apresentados na Tabela 1.

A Tabela 1 mostra que a maior produção de metano foi obtida a partir da digestão anaeróbia em único estágio com a cama de aviário pré-tratada termicamente. Segundo Paranhos (2021) isso se deve, provavelmente, à ação do pré-tratamento hidrotérmico na desintegração de substâncias poliméricas extracelulares presentes na cama de aviário, gerando substâncias

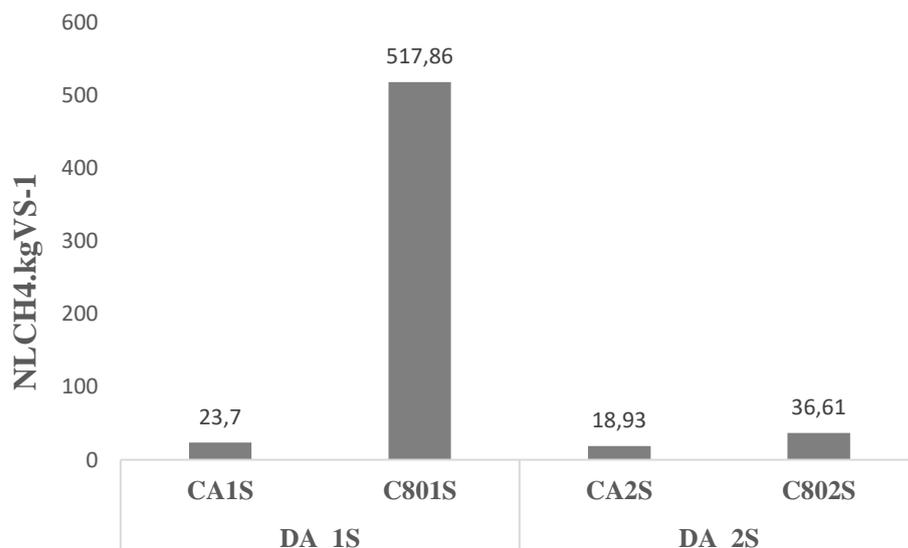
orgânicas solúveis, tais como carboidratos, proteínas, lipídios e AGVs (Yin et al., 2020), melhorando assim as condições de biodegradabilidade da matéria orgânica. Os valores mais baixos apontados nos experimentos de digestão anaeróbia em duplo estágio sugerem a ocorrência de inibição termodinâmica da metanogênese devido ao acúmulo de ácidos provenientes da fermentação bacteriana. Na figura 2 é possível observar graficamente os valores da produção de metano na cama de aviário com e sem pré-tratamento.

Considerando os resultados obtidos por Paranhos (2021), buscou-se avaliar se o pré-tratamento térmico, além de resultar em maior produção de metano, poderia levar a uma redução de bactérias resistentes à Tilosina. Esses resultados estão apresentados no item a seguir.

Tabela 1 - Produção de metano a partir da cama de aviário com e sem pré-tratamento.

Estágio	Código do experimento	(NLCH <sub>4</sub> .kgVS <sup>-1</sup> )	(NLCH <sub>4</sub> .kgDQO <sup>-1</sup> )
DA_1S	CA1S	23,70 ± 2,92	14,65 ± 0,14
	<b>C801S</b>	<b>517,86 ± 4,66</b>	<b>101,36 ± 0,91</b>
DA_2S	CA2S	18,93 ± 0,38	11,57 ± 3,96
	C802S	36,61 ± 3,78	6,97 ± 0,74

Fonte: PARANHOS, 2021



**Figura 3** - Produção de metano a partir da cama de aviário com e sem pré-tratamento. Legenda: DA1S: Digestão anaeróbia em único estágio; DA2S: Digestão anaeróbia em dois estágios; CA1S: Cama de aviário in natura sob digestão anaeróbia em único estágio; CA2S: Cama de aviário in natura sob digestão anaeróbia em duplo estágio; C801S: Amostra C80 submetida à digestão anaeróbia em único estágio; C802S: Amostra C80 submetida à digestão anaeróbia em único estágio. Fonte: O autor (2021)

## 5.2 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE BACTÉRIAS RESISTENTES A TILOSINA NAS AMOSTRAS SUBMETIDAS À DIGESTÃO ANAERÓBIA

As amostras de cama de aviário pré-tratadas a 80°C, cama de aviário pré-tratadas a 80°C, digeridas em único e duplo estágio, bem como a amostra de cama de aviário *in natura* foram avaliadas quanto a abundância de bactérias resistentes à Tilosina. Adicionalmente foram analisadas também a amostra de inóculo utilizada nos testes de digestão anaeróbia a fim de verificar a contribuição deste inóculo na abundância de bactérias resistentes à Tilosina.

Para isso realizou-se diluições das amostras e plaqueamento em meio PCA com e sem Tilosina, a fim de determinar a quantidade de bactérias resistentes e bactérias heterotróficas totais, respectivamente. A Tabela 2 apresenta as diluições utilizadas para a estimativa bacteriana.

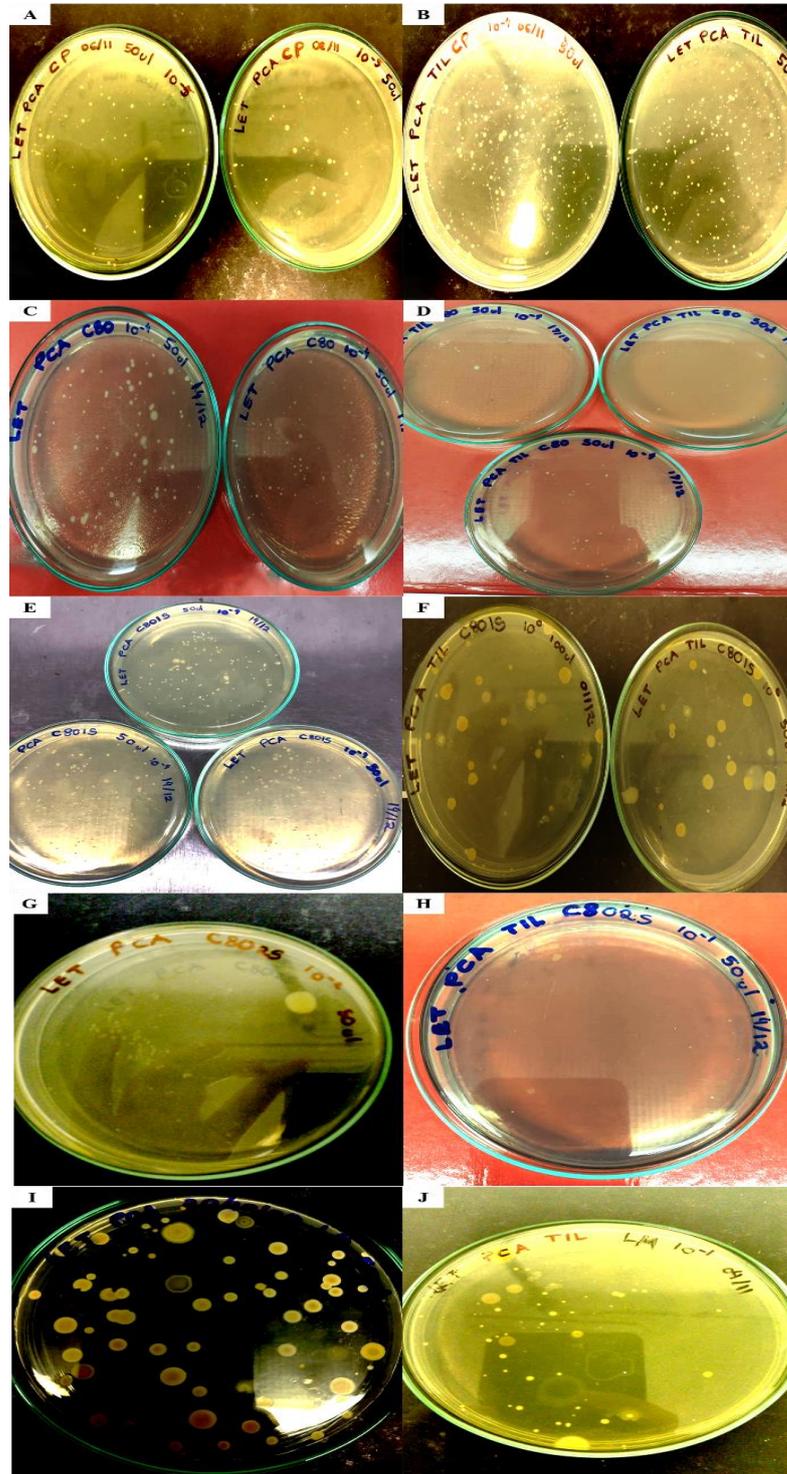
Tabela 2 - Diluição que proporcionou a contagem das bactérias em meio PCA

<b>Condições do isolamento</b>	<b>Diluição</b>
CN sem Tilosina	10 <sup>-5</sup>
CN com Tilosina	10 <sup>-4</sup>
C80 sem Tilosina	10 <sup>-4</sup>
C80 com Tilosina	10 <sup>-4</sup>
C801S sem Tilosina	10 <sup>-4</sup>
C801S com Tilosina	10 <sup>0</sup>
C802S sem Tilosina	10 <sup>-2</sup>
C802S com Tilosina	10 <sup>-1</sup>
IN sem Tilosina	10 <sup>-3</sup>
IN com Tilosina	10 <sup>-1</sup>

Legenda: CN=Cama de aviário *in natura* coletada no galpão de produção contendo frangos de corte matrizes com idade de 18 a 76 semanas, C80 = Cama de aviário pré-tratada à 80°C, C801S = Amostra C80 submetida à digestão anaeróbia em único estágio; C802S = Amostra C80 submetida à digestão anaeróbia em duplo estágio; IN: Inóculo metanogênico

A Figura 4 apresenta algumas imagens das placas de petri ilustrando o crescimento das colônias, nas quais as placas A, C, E, G e I foram incubadas sem a presença de Tilosina no meio, e as placas B, D, F, H, J continham Tilosina (10 mg/L). Na Figura 2 em A, B, C e D, observou-se que as colônias nos meios com e sem Tilosina eram similares, apresentando colônias brancas amareladas, transparentes e algumas colônias leitosas. Na Figura 2 em E, F, G, H, I e J, foram observadas maior diversidade entre as colônias nos meios com e sem Tilosina. Algumas colônias apresentavam tamanhos variados de formato oval, redondas, formato de teias e

algumas se apresentavam indefinidas. Elas também apresentavam diferentes cores, sendo alguns transparentes, algumas com coloração amarelada, alaranjada, brancas e leitosas.



**Figura 4.** Imagens das placas de petri ilustrando o crescimento das colônias nos tratamentos CN, C80, C801S, C802S e IN. Fonte: O autor.

Na Tabela 3 estão os dados de quantificação de unidades formadoras de colônias (UFCs/g) no meio com e sem antibiótico. É possível observar que a quantificação das unidades formadoras de colônias nos tratamentos sem antibiótico e com antibiótico indicaram que a amostra CN (controle), obteve a maior média de bactérias heterotróficas totais (BHTs) quando comparada com as amostras C80, C801S, C802S e IN.

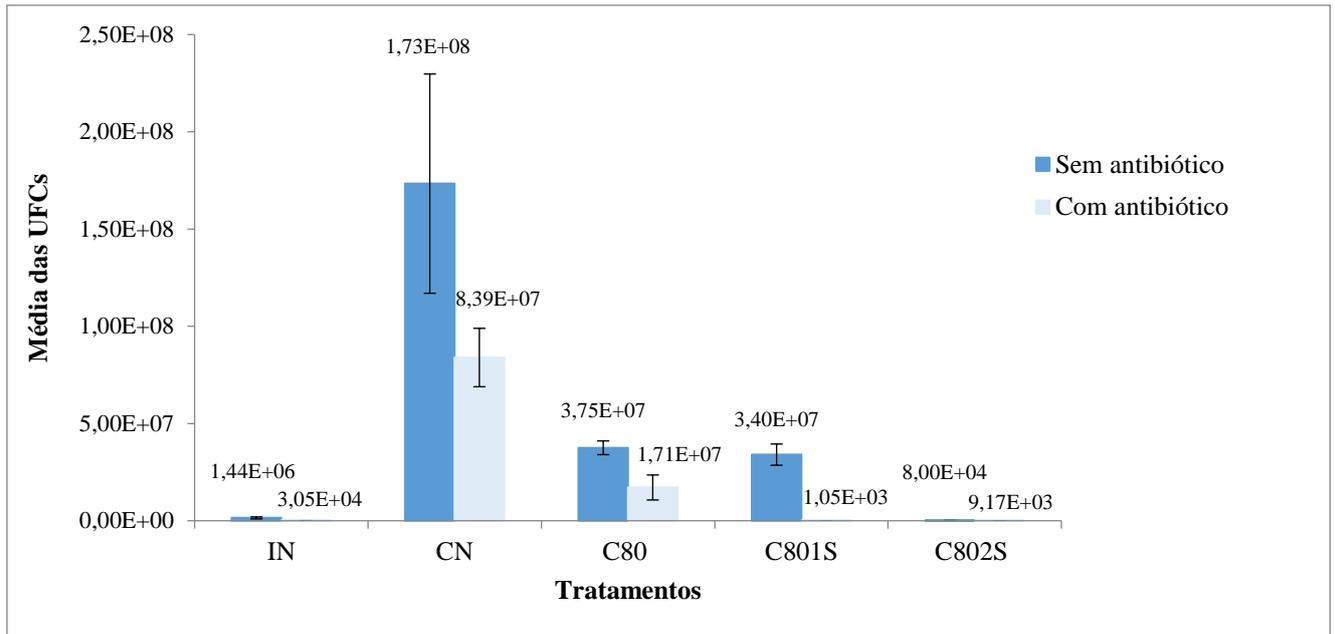
Tabela 3 - Efeito do uso do antibiótico Tilosina, desvio padrão na colonização por bactérias heterotróficas em cada um dos pré-tratamentos

Tratamentos	Sem antibiótico		Com antibiótico		
	Média (UFC/g)	Desvio Padrão	Média (UFC/g)	Desvio Padrão	p-valor
<b>CN</b>	$1,73 \times 10^8$	$5,64 \times 10^7$	$8,39 \times 10^7$	$1,50 \times 10^7$	<0.001
<b>C80</b>	$3,75 \times 10^7$	$3,53 \times 10^6$	$1,71 \times 10^7$	$6,43 \times 10^6$	<0.001
<b>C801S</b>	$3,40 \times 10^7$	$5,45 \times 10^6$	$1,05 \times 10^3$	$4,50 \times 10^2$	<0.001
<b>C802S</b>	$8,00 \times 10^4$	0	$9,17 \times 10^3$	$1,18 \times 10^3$	<0.001
<b>IN</b>	$1,44 \times 10^6$	$5,13 \times 10^5$	$3,05 \times 10^4$	$1,70 \times 10^4$	<0.001

Legenda: CN = cama de aviário in natura; C80 = cama de aviário submetida à 80°C; C801S = derivada da 80 submetida à digestão anaeróbia em único estágio; C802S = derivada da C80 e submetida à digestão anaeróbia em duplo estágio; IN = inóculo metanogênico (mistura de esterco de aves e lodo anaeróbio de reator UASB tratando esgoto sanitário). Os dados apresentados tiveram diferença significativamente estatística com  $p < 0,001$ .

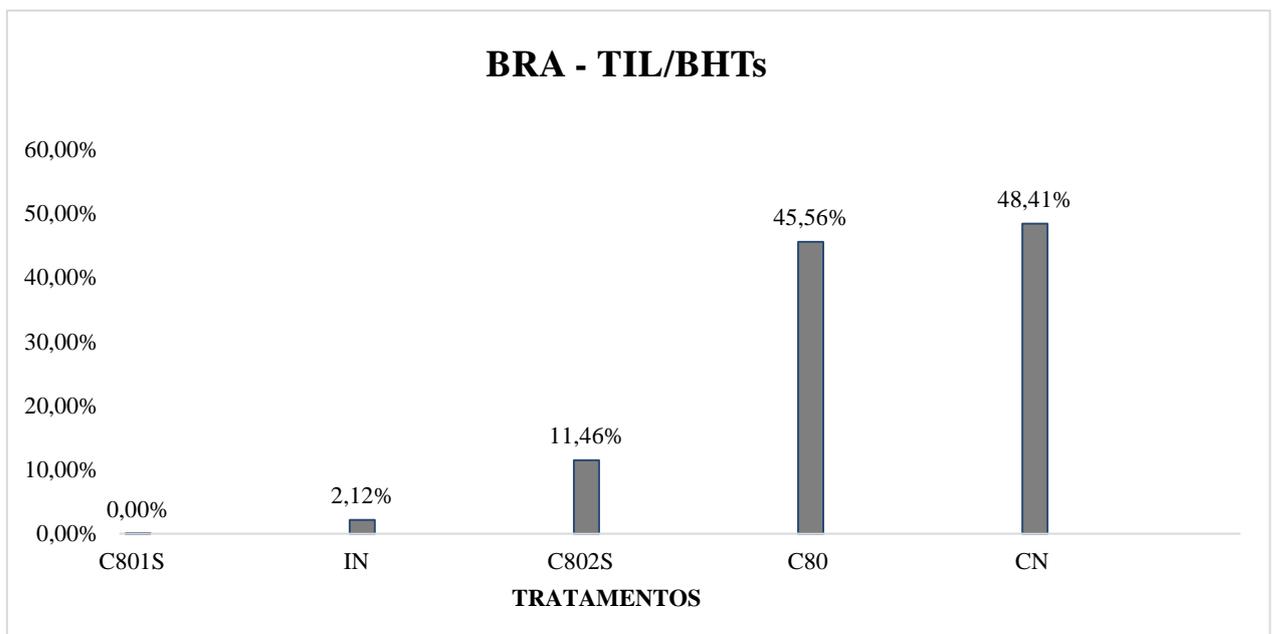
A Figura 5 apresenta graficamente os valores obtidos, onde é possível observar que a quantidade de bactérias não resistentes à Tilosina é maior que a quantidade de bactérias resistentes ( $p < 0,001$ ) em todas as amostras. Através desses dados é possível afirmar que o uso da Tilosina no meio de cultura diminuiu fortemente o número de colônias de bactérias heterotróficas em todos os pré-tratamentos. Ao comparar os valores de bactérias resistentes entre as amostras, observa-se o maior valor obtido para a cama de aviário *in natura* ( $8,39 \times 10^7$  UFC/g), no entanto, sua abundância diminuiu apenas em 4 vezes após o pré-tratamento térmico (C80  $1,71 \times 10^7$  UFC/g).

A quantidade de colônias de bactérias resistentes à Tilosina decaiu fortemente após a digestão anaeróbia da cama de aviário tratada termicamente. Essa redução se deve, provavelmente, à seleção de microrganismos adaptados ao ambiente ácido e anaeróbio, sendo o melhor resultado para a digestão em único estágio, com remoção de 5 logs na estimativa destas bactérias.



**Figura 5.** Quantificação de bactérias heterotróficas totais e bactérias resistentes à Tilosina nas amostras de cama de aviário submetidas à diferentes pré-tratamentos e inóculo (barras indicam  $\pm$  desvio padrão). Sendo: CN = cama de aviário in natura; C80 = cama de aviário submetida à 80°C; C801S = derivada da C80 e submetida à digestão anaeróbia em único estágio; C802S = derivada da C80 e submetida à digestão anaeróbia em duplo estágio; IN = inóculo metanogênico. Fonte: O Autor (2021)

A fim de comparar os resultados considerando a abundância relativa, ou seja, a porcentagem de bactérias resistentes em relação às bactérias heterotróficas totais, os valores foram calculados e expressos graficamente na Figura 6.



**Figura 6.** Abundância relativa de isolados bacterianos resistentes ao antibiótico Tilosina em relação ao total de bactérias heterotróficas totais em CN, C80, C801S, C802S e IN. Sendo: CN = cama de aviário in natura; C80 = cama de aviário submetida à 80°C; C801S = derivada da C80 e submetida à digestão anaeróbia em único estágio; C802S = derivada da C80 e submetida à digestão anaeróbia em duplo estágio; IN = inóculo metanogênico. Fonte: O Autor (2021)

Com relação à abundância relativa de bactérias resistentes a Tilosina em relação ao total de bactérias heterotróficas totais nas amostras de cama de aviário, sobre diferentes condições de tratamento, e de inóculo metanogênico, verificou-se maior porcentagem de bactérias resistentes a Tilosina na cama de aviário *in natura* e após o pré-tratamento térmico (48,00% e 45,56%, respectivamente). Este resultado indica que quase metade das bactérias presentes na cama de aviário são resistentes à Tilosina, provavelmente pelo contato direto entre elas e o antibiótico utilizado no manejo das aves. Os resultados revelaram ainda que o pré-tratamento reduz muito pouco a proporção de bactérias resistentes em relação ao total observado na cama de aviário *in natura*. Entretanto o pré-tratamento em condições adequadas aumenta a disponibilidade de matéria orgânica, além de propiciar o aumento na taxa de produção de metano durante o processo de digestão anaeróbia, conforme observado por Paranhos (2021) (Tabela 1).

Considerando a avaliação feita no inóculo, observa-se uma pequena porcentagem de bactérias resistentes à Tilosina, isso porque esse inóculo provém de um sistema de tratamento de esgotos e que, portanto, não sofre a ação de grandes concentrações de Tilosina, como acontece nas granjas de aves. No entanto, após submeter a cama de aviário pré-tratada à digestão anaeróbia em duplo estágio, esta proporção reduz significativamente, para 11,46%, e ainda se ressalta os valores menores que 0,5% após a digestão anaeróbia em único estágio, sendo este último o tratamento mais eficiente na remoção de bactérias. A diferença entre esses resultados pode ser atribuída ao aporte de bactérias resistentes durante a etapa metanogênica (2ª etapa) da digestão anaeróbia em duplo estágio, visto que o inóculo metanogênico utilizado possui, ainda que pouca (> 2%), certa quantidade de bactérias resistentes. Contudo, nota-se a importância do biodigestor na diminuição da proporção de bactérias resistentes a antibióticos.

Alguns estudos corroboram com os resultados apresentados neste trabalho. Segundo Farias (2012), a eficiência na redução dos microrganismos patogênicos durante a digestão anaeróbia está associada a temperatura da fermentação e ao tempo de retenção hidráulica, sendo que quanto maiores forem os seus valores mais eficientes será a redução de patógenos. Esta tendência de resultado também pode ser vista no presente trabalho em que ocorreu maior redução de bactérias resistentes a Tilosina após submeter a cama de aviário ao pré-tratamento térmico seguido da digestão anaeróbia em único e duplo estágios. Steil (2001) utilizou resíduos de aves de postura, frangos de corte e suínos na digestão anaeróbia e o tratamento anaeróbio revelou-se eficiente na remoção de coliformes totais e fecais.

Onan e Lapara (2003) avaliou a abundância relativa de bactérias resistentes a Tilosina em seis tipos de amostras de solo de três locais agrícolas afetados pelo uso de antibióticos e três

locais não afetados, e detectou bactérias resistentes em cada amostra. Em seu trabalho, a maior abundância relativa (proporção de bactérias resistentes à Tilosina em relação ao número total de bactérias cultivadas) foi observada nos três locais afetados pelo uso de antibióticos subterapêuticos (7,2 - 16,5%) quando comparados com os três locais não afetados por uso de antibióticos (0,7 - 2,5%).

Apesar da cama de aviário passar por um pré-tratamento térmico e pela digestão anaeróbia em único e duplo estágio, não ocorre a eliminação total das BRAs. Contudo a cama tratada tem risco menor de ser lançada ao meio ambiente quando sem tratamento nenhum. Dessa forma, o uso dessa cama deve ser realizado com restrições ou aplicados pós-tratamentos para inativação das bactérias patogênicas ou resistentes aos antibióticos presentes. Assim torna-se importante estratégias que visem a minimização de bactérias resistentes a antibióticos em matrizes ambientais

### 5.3 IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS PRESENTES NO RESÍDUO DE AVICULTURA POR BIOLOGIA MOLECULAR

As colônias de bactérias resistentes à Tilosina previamente selecionadas foram re-isoladas e submetidas à extração de DNA e amplificação do gene RNAr 16S e enviadas para sequenciamento. Inicialmente foram selecionadas para identificação 22 colônias, porém apenas 11 delas foram enviadas para sequenciamento.

Em todas as amostras foram selecionados isolados com diferentes morfologias. Na tabela 3 está descrito o código das amostras selecionadas para extração de DNA e amplificação do gene RNAr 16S, a origem das amostras e o resultado da coloração de Gram.

Tabela 4 - Descrição da origem das colônias presentes na imagem do gel de agarose e resultado da coloração de Gram.

<b>Código das amostras selecionadas para identificação</b>	<b>Origem das amostras</b>	<b>Resultado coloração de Gram</b>
1	CN	Gram negativas
2	CN	Gram negativas
3	CN	Gram negativas
5	C80	Gram positivas
6	C80	Gram negativas
7	C801S	Gram negativas
9	C801S	Gram negativas
13	C802S	Gram negativas
17	IN	Gram negativas
18	IN	Gram positivas
20	IN	Gram negativas

Legenda: CN=Cama de aviário in natura coletada no galpão de produção contendo frangos de corte matrizes com idade de 18 a 76 semanas, C80 = Cama de aviário pré-tratada à 80°C, C801S = Amostra C80 submetida à digestão anaeróbia em único estágio; C802S = Amostra C80 submetida à digestão anaeróbia em duplo estágio; IN: Inóculo metanogênico

O gel de agarose foi realizado com as amostras identificadas como 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 13, 17, 18 e 20 provenientes do presente trabalho, e com outras amostras de outra aluna do grupo de pesquisa.

A figura 7 apresenta a imagem do gel de agarose em eletroforese após a amplificação por PCR, e purificação visualizado por um aparelho transluminador com luz UV. Nesta figura foi possível observar a banda bem visível e aparentemente boa qualidade do DNA extraído. No entanto as amostras de DNA foram enviadas para o laboratório Genomic Engenharia Molecular e o resultado do sequenciamento não foi satisfatório, uma vez que a qualidade dos cromatogramas não permitiram uma identificação precisa das bases nitrogenadas. Novas tentativas de sequenciamento serão futuramente realizadas.



**Figura 7.** Imagem gel de agarose. Fonte: O autor (2021)

## 6 CONCLUSÃO

A resistência bacteriana é um problema de saúde pública. Como foi visto no trabalho, há bactérias resistentes ao antibiótico Tilosina presentes em resíduos provenientes de empresa de frango, e o gerenciamento adequado desse rejeito é necessário, porque uma vez despejado no ambiente de forma inadequada, torna-se uma fonte de disseminação de microrganismos resistentes a antibióticos que afetam a saúde e o meio ambiente. Contudo a partir das análises realizadas neste estudo foi observado que o pré-tratamento térmico da cama de aviário a 80°C, seguido da digestão anaeróbia em único estágio deste resíduo, se mostrou uma alternativa eficiente para remoção dessas bactérias resistentes a Tilosina e dos impactos causados pela cama de aviário sem tratamento nenhum ao meio ambiente.

## 7 REFERÊNCIAS

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2018. ABPA, 2018.

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2018. ABPA, 2021.  
<https://abpa-br.org/exportacoes-de-carne-de-frango-crescem-164-em-julho/> Acesso em 13 de agosto de 2021

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resistência antimicrobiana é ameaça global, diz OMS. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de>. Acesso em: 06 jul. 2021;

ALVES, J.; ZANATO, F. Produção E Qualidade Do Biogás Gerado Com Os. 2014.

ALTERTHUM, F. Microbiologia. 6º Edição

ARAÚJO, A. P. C. Produção de biogás a partir de resíduos orgânicos utilizando biodigestor anaeróbico. Universidade Federal de Uberlândia. Faculdade de Engenharia Química, dissertation of graduation in portuguese - Uberlândia. p. 42, 2017.

AVILA, V. S. DE *et al.* Revista Brasileira de Zootecnia Avaliação de materiais alternativos em substituição à maravalha como Alternative material to replace wood shavings as broiler litter. n. 1996, 2008.

COR, T. *et al.* Resistencia bacteriana. v. 32, n. 1, p. 44–48, 2003.

COSTA, R. P. DA *et al.* Tilosina: um importante antibiótico não monitorado em leite no Brasil. Segurança Alimentar e Nutricional, v. 20, n. 2, p. 245, 2015.

COSTA, Avaliação da estabilidade do antibiótico macrolídeo Tilosina em leite submetido a diferentes condições de processamentos térmicos. 2014. Dissertação (Mestrado) Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

CRAWLEY, M. J. 2013. The R Book. John Wiley and Sons. Nova Iorque. 2 ed. 1060p. Equipe central de desenvolvimento R (2021). R: Uma linguagem e ambiente para computação estatística. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

DA CUNHA SILVEIRA, D.; MONACO VIEIRA, F. Caracterização da geração de resíduos da produção de frangos de corte. Naturae, v. 2, n. 1, p. 34–39, 2020.

DA SILVA FILHO, L. V. R. F.; PINTO, L. A.; STEIN, R. T. Use of macrolides in lung diseases: recent literature controversies. Jornal de Pediatria (Versão em português), v. 91, n. 6, p. S52–S60, 2015.

DIAS, C. de P. Análise da presença de bactérias resistentes a antimicrobianos em sistema de tratamento de dejetos de suinocultura. 2018. 87 f. Dissertação (Mestrado) Curso de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018;

FARIAS, R.M. *et al.* Biodigestão anaeróbia de dejetos de poedeiras coletados após diferentes períodos de acúmulo. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.42, n6 p1089-1094, jun,2012

FUCHS, F. D. Principios gerais do uso de antibioticos. In: FUCHS, F. D.;WANNMACHER, L.;FERREIRA, M. B. C.Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010. cap.27, p. 342-59.

HAHN, L. Processamento da cama de aviário e suas implicações nos agroecossistemas; TESE (Mestrado em Agroecossistemas) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, Maio de 2004

JÚNIOR, M. A.P.O. *et al.* **Biodigestão anaeróbia dos resíduos da produção avícola:** cama de frangos e carcaças. 1 Doutorado em Zootecnia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal – *S. Eng. Agríc., Jaboticabal*, v.30, n.3, p.546-554, maio/jun, 2010.

LIMA, C. C.; BENJAMIM, S. C.; SANTOS, R. F. S. DOS. Mecanismo De Resistência Bacteriana Frente Aos Fármacos: Uma Revisão. *Cuidarte Enfermagem*, v. 11, n. 1, p. 105–13, 2017.

MACHADO, E. C. *et al.* Detecção e quantificação de bactérias resistentes aos antibióticos ampicilina e cloranfenicol em estações de tratamento de esgoto doméstico. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, v. 25, n. 6, p. 847–857, 2020.

MACHADO, J. B. DE A. Uso da biblioteca genômica RNAr 16S como ferramenta para o estudo da microbiota fecal humana. p. 81, 2013.

MELO, V. V. *et al.* GUIA DE ANTIMICROBIANOS 2012. Universidade Federal de Goiás. Disponível em <file:///C:/Users/Letícia%20Dias/Desktop/Guia\_de\_Antimicrobianos\_do\_HCUFG.pdf>. Acesso em: 08 nov. 2019;

MONIQUE, C. *et al.* Fatores que influenciam o processo de digestão anaeróbia na produção de biogás Factors that influence the anaerobic digestion process in biogas production. p. 509–514, 2017.

ONAN, L. J.; LAPARA, T. M. Tylosin-resistant bacteria cultivated from agricultural soil. **FEMS Microbiology Letters**, v. 220, n. 1, p. 15–20, 2003.

Ok, Yong Sik *et al.* Monitoring of Selected Veterinary Antibiotics in Environmental Compartments near a Composting Facility in Gangwon Province, Korea. *Environmental Monitoring and Assessment*, 174(1–4), pp.693–701. 2011.

PALERMO NETO, J. *et al.* Antimicrobianos Como Aditivos Em Animais de Produção. In *Farmacologia Aplicada À Medicina Veterinária*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp.641–58, 2006.

PARANHOS, A. G. de O. Degradação e efeito de antimicrobianos em reatores anaeróbios tratando cama de aviário. Tese (Doutorado) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto. 98 f. 2021.

RAO, U., BIRMAHER, B., KAUFMAN, J., RYAN, N. D., & BRENT, D. A. (2007). K-SADS-PL. CHILDREN (K-SADS), 39(1996), 49–58. *et al.* No Title肯定・否定表現における日本語程度副詞について. n. February 1921, p. 1–4, 2002.

REGITANO, J. B.; MARQUES, R.; LEAL, P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal. n. 1, p. 601–616, 2010.

REVERÓN, F. *et al.* Resistencia bacteriana. v. 32, n. 1, p. 44–48, 2003.

R Development Core Team 2021 R: R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.URL

SANTOS, D. V. DE A. DOS *et al.* Antibióticos Através Da Abordagem Do Mecanismo De Resistência Bacteriana. *Ciência Atual - Revista Multidisciplinar das Faculdades São José*, v. 11, n. 1, p. 2–14, 2018.

STEIL, L. Avaliação do uso de inóculos na biodigestão anaeróbia de resíduos de aves de postura, frangos de corte e suínos. *Aleph*, p. 109 f., 2001.

VAN BOECKEL, T. P. *et al.* Global antibiotic consumption 2000 to 2010: An analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 14, n. 8, p. 742–750, 2014.

YIN, F., DONG, H., ZHANG, W., ZHU, Z., & SHANG, B. Additional function of pasteurisation pretreatment in combination with anaerobic digestion on antibiotic removal. *Bioresource technology*, 297, 122414, 2020.