

ANÁLISE DA CITOGENOTOXICIDADE DE EFLUENTE DE SUINOCULTURA ANTES E APÓS TRATAMENTO EM BIODIGESTOR

Gabriele Bitencourt Tavares¹, Victor Ventura de Souza², Tatiana da Silva Souza¹

¹Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Bairro Alto Universitário – 29.500-000 – Alegre/ES, Brasil, gabrielebtavares@gmail.com, tatianas.souza@hotmail.com.

²Universidade Federal de Minas Gerais/Departamento de Morfologia, Avenida Antônio Carlos, Bairro Pampulha – 31.270-901 – Belo Horizonte/MG, Brasil, victorventurabh@yahoo.com.br.

Resumo

A produção de carne suína gera grande volume de dejetos com quantidade significativa de matéria orgânica e patógenos. Se não tratados adequadamente, esses dejetos podem provocar graves impactos ambientais. O uso de biodigestores na suinocultura permite a mitigação desses impactos. Assim, a análise ecotoxicológica desse resíduo antes (afluente) e após (efluente) o tratamento via biodigestor se faz necessária. O presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos citogenotóxicos do afluente e efluente provenientes de uma suinocultura. Sementes de *A. cepa* foram expostas ao efluente e afluente bruto (100%) e a diferentes diluições (3.1%, 6.25%, 12.5%, 25% e 50%). Os parâmetros analisados foram: índice mitótico (IM) e a presença de aberrações cromossômicas (AC) e micronúcleos (MN). Observou-se uma redução do IM em todas as concentrações do afluente e efluente, exceto na menor concentração (3.1%) e um aumento de AC a 3.1 e 12.5% do afluente e a 3.1%, 12.5% e 50% do efluente. Nenhuma amostra induziu MN. O sistema de tratamento não foi totalmente eficaz em reduzir a citogenotoxicidade dos dejetos de suinocultura (afluente) para o sistema teste *A. cepa*.

Palavras-chave: *Allium cepa*. Índice mitótico. Aberrações cromossômicas.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas – Genética.

Introdução

O Brasil é o quarto maior produtor de carne suína do mundo. De acordo com a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), o Brasil produziu 5.156 milhões de toneladas de carne suína em 2023. Em consonância, a suinocultura gera uma grande quantidade de dejetos, que são ricos em nutrientes, como nitrogênio (N) e fósforo (P), metais pesados, como zinco (Zn) e cobre (Cu), além de microrganismos fecais patogênicos. Se não tratados adequadamente, esses dejetos podem provocar graves impactos ambientais (Ito *et al.*, 2016).

O uso de biodigestores na suinocultura é uma prática que visa a redução destes impactos. Dentro do biodigestor, os dejetos passam por um processo de fermentação anaeróbica. Esse processo ocorre em várias fases, onde a matéria orgânica é convertida em biogás, que pode ser utilizado como fonte de energia, e em biofertilizantes, que é despejado no meio ambiente ou utilizado na agricultura (Wang, *et al.*, 2020). Entretanto, de acordo com Ghava *et al.* (2015) após o processo de biodigestão, os efluentes ainda constituem uma alta concentração de matéria orgânica, metais, bactérias e antibióticos, podendo assim acarretar danos para os ecossistemas terrestre e aquático.

O sistema *Allium cepa* (cebola) é uma das ferramentas utilizadas para avaliar possíveis efeitos tóxicos de diversos contaminantes ambientais (Leme e Marin-Morales, 2009; Martins *et al.*, 2016; Fiorese, *et al.*, 2020; Souza *et al.*, 2021), além da sua correlação com outros sistemas-testes, tais como linfócitos humanos e roedores (Rank e Nielsen, 1994; Leme e Marin-Morales, 2009). Os ensaios com *A. cepa* avaliam o efeito da substância no ciclo celular (citotoxicidade) e no material genético (genotoxicidade e mutagenicidade em nível cromossômico), permitindo compreender seu mecanismo de ação. Isso é possível devido às suas particularidades: 1) alta sensibilidade; 2) grande número de células em divisão e; 3) cromossomos grandes e em número reduzido ($2n=16$) (Fiskejö, 1985; Leme

e Marin-Morales, 2008). Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial citogenotóxico de efluente de suinocultura antes e após tratamento em biodigestor por meio do bioensaio com *A. cepa*.

Metodologia

Coleta do afluente e efluente

As amostras de afluente (antes do processo de biodegradação a partir de um biodigestor) e de efluente (após o processo de biodegradação) foram coletadas a partir da Norma 15469/2015 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2015), em um empreendimento que explora economicamente a suinocultura, localizado no distrito de Rive - Alegre, Espírito Santo ($20^{\circ}47'09''$ S e $41^{\circ}31'28''$ W).

Uma alíquota das amostras foi encaminhada para o Laboratório de Análises e Controle de Qualidade (Agrolab) para caracterização físico-química. Os parâmetros avaliados foram: pH, temperatura, demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), fósforo, nitrogênio, potássio e coliformes termotolerantes. Outra fração das amostras foi encaminhada para o Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Federal do Espírito Santo onde os testes com *A. cepa* foram conduzidos. Para esses ensaios, foram testadas as amostras não diluídas do afluente e efluente (100%), e diluições em água mineral nas concentrações: 3.1%, 6.25%, 12.5%, 25% e 50%, preparadas de acordo com a Norma 15469/2015 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2015).

Bioensaio com *Allium cepa*

Aproximadamente 100 sementes de *A. cepa* (variedade baia periforme) foram organizadas em placas de Petri em contato com papel filtro umedecido com 5 ml das amostras. Água mineral (Ingá) e colchicina (Sigma®) 0,025% foram utilizadas como controle negativo (CN) e positivo (CP), respectivamente. A germinação ocorreu no escuro a $24\pm1^{\circ}\text{C}$. Após 72h, as raízes foram fixadas em álcool etílico + ácido acético na proporção 3:1 (v/v) e armazenadas a -20°C . Após 24h, as raízes foram lavadas por três vezes em água destilada por cinco minutos, hidrolisadas em HCl 5N por 8 minutos a $60\pm1^{\circ}\text{C}$ e lavadas em água destilada. A região meristemática das raízes foi submetida ao reativo de Schiff por 2 horas no escuro e contra corada com carmim acético a 2%, recoberta por lamínula e macerada. O material foi analisado em microscópio de luz com aumento de 1000 x. Para cada tratamento foram analisadas 5.000 células (500 células por lâmina).

O potencial citotóxico do afluente e efluente e suas diluições foi analisado por meio do cálculo do índice mitótico (IM). Já o potencial genotóxico foi avaliado por meio da contagem de anormalidades mitóticas e cromossômicas (C-metáfases, broto nuclear, aderências, perdas e pontes cromossômicas). Micronúcleos (MN) meristemáticos foram contabilizados para a determinação do potencial mutagênico.

O software utilizado para a análise estatística foi *GraphPad Prism* 8.0.1. Os dados coletados não apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variâncias, portanto as comparações entre os grupos foram feitas pelo teste de Kruskal-Wallis (teste estatístico não-paramétrico) seguido pelo teste de Dunn ($p<0.05$).

Resultados

Caracterização físico-química e microbiológica do afluente e do efluente

Os resultados da análise físico-química do afluente e efluente são mostrados na Tabela 1. No Brasil, a Resolução n. 430 de 2011 e a Resolução n. 357 de 2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) dispõem sobre os padrões e condições de lançamento de efluentes. Assim, com base nos valores máximos permitidos pelo CONAMA, o pH do afluente apresentou um valor abaixo do permitido e o nitrogênio (N) do afluente apresentou um valor acima do permitido. Os elementos fósforo (P) e potássio (K) não possuem padrões regulamentados pelo CONAMA. Entretanto, observou-se uma diminuição da concentração dos elementos, N, P e K do afluente para o efluente: o N reduziu 71.88%, o P reduziu 32.83% e o K reduziu 52.24%. Houve um aumento da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e da Demanda Química de Oxigênio (DQO) do afluente para o efluente, indicando elevada carga

de matéria orgânica e alto nível de contaminação do efluente. Já a concentração de coliformes termotolerantes foi reduzida em 64.44% no efluente.

Tabela 1 – Avaliação físico-química e microbiológica dos efluentes suíno antes e após tratamento com biodigestor.

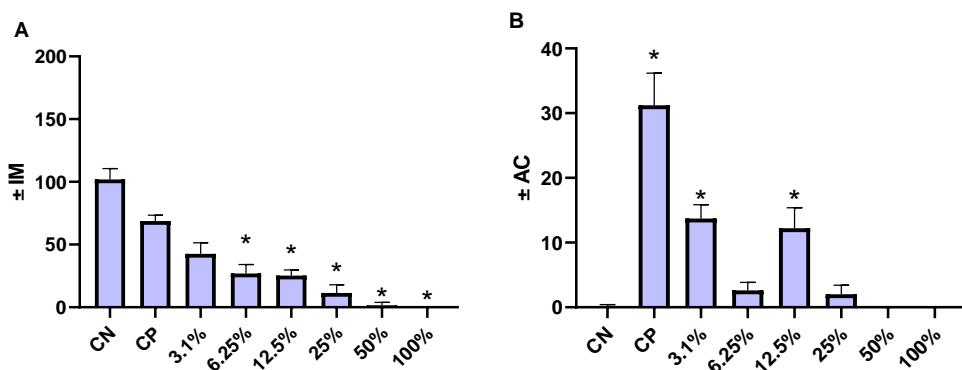
Parâmetro	Afluente	Efluente	Valores máximos permitidos pela Res. 430/2011 do CONAMA
pH	4.2	6.3	5 a 9
Temperatura	24.3 °C	27.3 °C	Inferior a 40 °C
DQO	2500 mg O ₂ L ⁻¹	8500 mg O ₂ L ⁻¹	-
DBO	5600 mg L ⁻¹	7600 mg L ⁻¹	-
Nitrogênio (N)	345 mg L ⁻¹ *	97 mg L ⁻¹	120 mg L ⁻¹
Fósforo (P)	14.07 mg L ⁻¹	9.45 mg L ⁻¹	-
Potássio (K)	67 mg L ⁻¹	32 mg L ⁻¹	-
Coliformes	9,0 x 10 ⁶	3,2 x 10 ⁶	-

Fonte: Agrolab.

Citogenotoxicidade do afluente e efluente

O afluente a 100% inibiu completamente a divisão celular do meristema de *A. cepa*. Além disso, todas as diluições do afluente, exceto 3.1%, reduziram significativamente o índice mitótico, numa relação dose-dependente, em relação ao controle negativo (Figura 1A). As concentrações 3.1% e 12.5% foram genotóxicas (Figura 1B): aderência e broto nuclear foram as principais alterações induzidas por estas concentrações. A ausência de AC a 50 e 100% pode ser explicado pelo baixo IM nesses tratamentos. Ademais, nenhuma amostra apresentou atividade mutagênica nas células meristemáticas (Tabela 2).

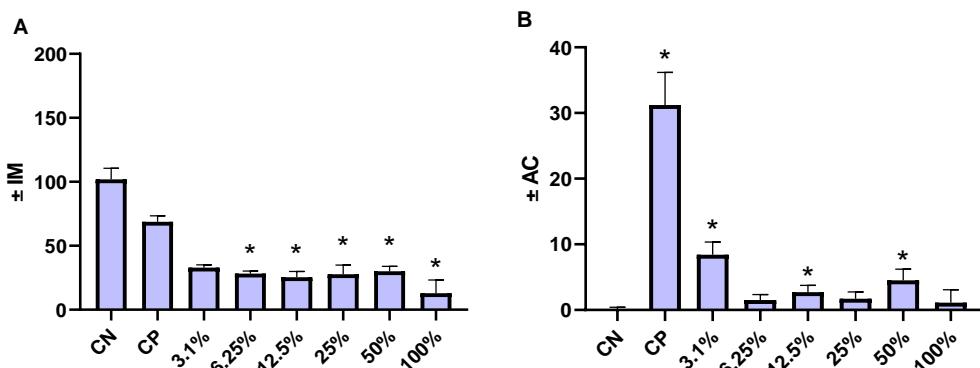
Figura 1 – Média da citogenotoxicidade do afluente. A: Média do IM; B: Média de AC. (*) significativo em relação ao controle negativo (CN). CP: controle positivo.



Fonte: Autores.

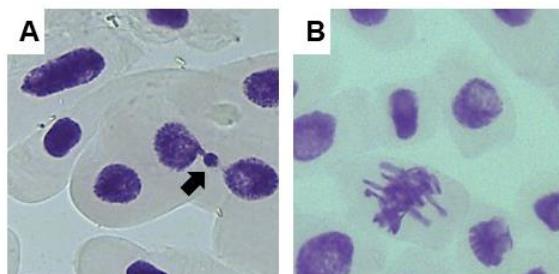
Considerando o efluente a 100% e suas diluições, todas as amostras reduziram o índice mitótico em relação ao controle negativo, com exceção da diluição de 3.1% (Figura 2A). O efluente (100%) não foi genotóxico. De forma oposta, as diluições de 3.1%, 12.5% e 50% aumentaram a frequência de aberrações cromossômicas (Figura 2B): aderência (Figura 3A) e broto nuclear foram evidentes (Figura 3B) a 3.1% e 50%. Nenhuma concentração induziu efeito mutagênico nas células meristemáticas (Tabela 2).

Figura 2 – Média da citogenotoxicidade do efluente. A: Média do IM; B: Média de AC. (*) significativo em relação ao controle negativo. CP: Controle positivo.



Fonte: Autores.

Figura 3 – Alterações cromossômicas em *A. cepa*. A) Broto nuclear; B) Aderência cromossômica.



Fonte: Autores.

Quando comparados os efeitos do afluente com o do efluente (Tabela 2), foi possível observar que após a passagem pelo biodigestor, a houve um aumento do IM para as concentrações (25, 50 e 100%). O efluente a 25 e 50% são menos citotóxicos que os seus respectivos afluentes. Porém, ainda citotóxicos em relação ao controle. Já o efluente à 50% foi mais genotóxico do que seu respectivo afluente.

Tabela 2 - Média ± desvio padrão das análises de índice mitótico, aberrações cromossômicas e micronúcleo do afluente e efluente. (*) significativo em relação ao controle negativo. (^b) estatisticamente diferente quando comparado a mesma concentração do afluente e efluente. CP: controle positivo.

Diluição	IM	AC	MN	MN F1
CN	101.90 ± 8.60	0.10 ± 0.31	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
CP	68.70 ± 4.64	31.20 ± 4.98*	5.60 ± 1.40*	3.3 ± 1.10
Afluente	3.1%	32.90 ± 2.13	13.70 ± 2.16*	0.0 ± 0.0
	6.25%	26.90 ± 7.24*	10.60 ± 1.26	0.0 ± 0.0
	12.5%	25.40 ± 4.47*	13.27 ± 1.67*	0.0 ± 0.0
	25%	11.40 ± 6.50* ^b	2 ± 1.40	0.0 ± 0.0
	50%	1.50 ± 2.36* ^b	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0
	100%	0.0 ± 0.0*	0.0 ± 0.0*	0.0 ± 0.0
Efluente	3.1%	42.50 ± 2.10	8.40 ± 1.95*	0.0 ± 0.0
	6.25%	28.30 ± 2*	3 ± 0.94	0.0 ± 0.0
	12.5%	29.40 ± 4.41*	2.70 ± 1*	0.0 ± 0.0
	25%	27.70 ± 7.22* ^b	1.70 ± 1.05	0.0 ± 0.0
	50%	30.10 ± 3.84* ^b	4.50 ± 1.71* ^b	0.0 ± 0.0
	100%	11.60 ± 3.20*	1.10 ± 1.96	0.0 ± 0.0

Fonte: Autores.

Discussão

A citotoxicidade é avaliada pelo aumento ou diminuição do índice mitótico, que é determinado pelo número de células em divisão em relação ao número total de células avaliadas. O aumento do IM pode estar relacionado ao acúmulo de células em fases específicas da mitose (Souza *et al.*, 2023). Por outro lado, a redução do IM, observada neste estudo em todas as diluições do afluente e efluente, exceto na menor diluição (3,1%), pode indicar uma inibição ou atraso da divisão celular. A inibição do IM pode ocorrer devido à ação mitodepressiva de agentes químicos (Türkoğlu, 2011). A redução do IM pode ocorrer devido ao bloqueio do ciclo na fase G1 em resposta a danos no DNA, inibindo a replicação na fase S; ou o acúmulo de células em G2 devido a falhas na replicação do DNA ou na formação do fuso mitótico (Fiorese *et al.*, 2020; Souza *et al.*, 2023).

A genotoxicidade e a mutagenicidade são avaliadas pelo aumento da frequência de aberrações cromossômicas e micronúcleos. Aberrações cromossômicas são caracterizadas como alterações cromossômicas estruturais ou numéricas que podem ocorrer espontaneamente ou devido à exposição a agentes químicos. De acordo com Leme e Marin-Morales (2009), as aderências cromossômicas são resultado de agentes aneugênicos e os brotos nucleares são resultado tanto de agentes aneugênicos quanto de agentes clastogênicos (Lindberg *et al.*, 2007). Alterações cromossômicas causadas por agente aneugênico estão relacionadas a distúrbios no fuso mitótico, resultando em um atraso na migração dos cromossomos para os polos da célula (Fernandes *et al.*, 2009). Por outro lado, alterações cromossômicas causadas por agentes clastogênicos são caracterizadas pelo rompimento de uma parte do material genético (quebras cromossômicas) e, devido à ausência de telômeros podem resultar em pontes cromossômicas (Leme e Marin-Morales, 2009).

Em um estudo recente, Aragão *et al.* (2024) avaliaram o risco tóxico de efluente de um biodigestor de suinocultura em *A. cepa* (cebola) e *Lactuca sativa* (alface). Os autores avaliaram dois efluentes: o efluente bruto, que é o resíduo resultante após a biodigestão, e o efluente de uma lagoa de estabilização, onde são armazenados os resíduos produzidos pelo biodigestor, em oito diferentes diluições: 100% (C1), 50% (C2), 25% (C3), 12,5% (C4), 6,25% (C5), 3,12% (C6), 0,78% (C7) e 0,39% (C8). No ensaio com *A. cepa*, os autores observaram, nos tratamentos com o efluente da lagoa de estabilização, uma redução significativa do índice mitótico nas concentrações C3 e C4 e alterações cromossômicas significativas em C4 e C6. Alterações cromossômicas também foram evidentes em C5 e C6, nos tratamentos com o efluente bruto.

Conclusão

Conclui-se que tanto o afluente quanto o efluente apresentaram potencial citotóxico e genotóxico em células meristemáticas de *A. cepa*, por meio da redução do índice mitótico e pela presença de aberrações cromossômicas (aderências e brotos nucleares). Portanto, o sistema de tratamento não foi totalmente eficaz em reduzir a toxicidade dos dejetos de suinocultura (afluente) para o sistema teste *A. cepa*. São necessários mais estudos sobre o risco tóxico dos efluentes.

Referências

ARAGÃO, Francielen Barroso et al. Toxic risk evaluation of effluents from a swine biodigester in the plant models *Lactuca sativa* and *Allium cepa*. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 196, n. 1, p. 64, 2024.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos d'água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, 18 mar. 2005. p. 58-63.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, 16 maio 2011. p. 89-92.

FERNANDES, Thaís Cristina Casimiro et al. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent—Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 72, n. 6, p. 1680-1686, 2009.

FIORESI, Vinicius Sartori et al. Cytogenotoxic activity of the pesticides imidacloprid and iprodione on *Allium cepa* root meristem. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 28066-28076, 2020.

FISKESJÖ, Geirid. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 312, n. 1, p. 17-24, 1994.

ITO, Minoru et al. Impactos ambientais da suinocultura: desafios e oportunidades. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 44, p. 125-156, 2016.

LEME, Daniela Morais; MARIN-MORALES, Maria Aparecida. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—a case study. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 650, n. 1, p. 80-86, 2008.

LEME, Daniela Morais; MARIN-MORALES, Maria Aparecida. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation research/reviews in mutation research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

LINDBERG, Hanna K. et al. Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 617, n. 1-2, p. 33-45, 2007.

MARTINS, Maria Nilza Corrêa et al. Genotoxic and mutagenic effects of sewage sludge on higher plants. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 124, p. 489-496, 2016.

SOUZA, Tatiana da Silva et al. Cytogenotoxicity of the water and sediment of the Paraopeba River immediately after the iron ore mining dam disaster (Brumadinho, Minas Gerais, Brazil). **Science of the Total Environment**, v. 775, p. 145193, 2021.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES).