

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIENCIAS AGRARIAS E VETERINARIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**IMPACTO DO USO DE ANTIBIÓTICOS
NA MICROBIOTA DO SOLO**

Jefferson Cerquera Gallego
Médico Veterinário Zootecnista

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIENCIAS AGRARIAS E VETERINARIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**IMPACTO DO USO DE ANTIBIÓTICOS
NA MICROBIOTA DO SOLO**

**Jefferson Cerquera Gallego
Orientador: Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

2016

Cerquera Gallego, Jefferson
C416i Impacto do uso de antibióticos na microbiota do solo / Jefferson
Cerquera Gallego. -- Jaboticabal, 2016
viii, 50 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientador: Everlon Cid Rigobelo
Banca examinadora: Mariana Carina Figieri Salaro, Fábio Camilotti
Bibliografia

1. Antibióticos veterinários. 2. Comunidades microbianas. 3.
Microcosmos. 4. Solo. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:615.33

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: IMPACTO DO USO DE ANTIBIÓTICOS NA MICROBIOTA DO SOLO


AUTOR: JEFFERSON CERQUERA GALLEGO

ORIENTADOR: EVERLON CID RIGOBELLO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. EVERLON CID RIGOBELLO
Departamento de Produção Vegetal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. MARIANA CARINA FRIGIERI SALARO
Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza / FATEC - Jaboticabal/SP



Prof. Dr. FÁBIO CAMILOTTI
Centro Est. de Educação Tecnológica Paula Souza / FATEC - Jaboticabal/SP

Jaboticabal, 09 de dezembro de 2016.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Jefferson Cerquera Gallego – nascido na cidade de Puerto Rico, Caquetá – Colombia, no dia 18 de fevereiro de 1990, filho de William Jorge Cerquera Riveros e Eneida Gallego Vasco. Graduado em Medicina Veterinária e Zootecnia pela Universidad de La Amazonia – Florencia, em maio de 2014. No mês de agosto do mesmo ano ingressou ao curso de pós-graduação em Microbiologia Agropecuária no nível de mestrado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista – Câmpus de Jaboticabal, sob a orientação do Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota”

Theodore Roosevelt

Dedico este trabalho a Deus, por ter me dado a força e a coragem durante esta longa caminhada. A minha mãe Eneida, meu irmão Eric e meu pai William, meus maiores incentivadores em todas as circunstâncias.

“Você pode dizer adeus a sua família e a seus amigos e afastar-se milhas e milhas e, ao mesmo tempo, carregá-los em seu coração, em sua mente, em seu estômago, pois você não apenas vive no mundo, mas o mundo vive em você”

Frederick Buechner

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, pela força e a coragem nos momentos mais difíceis deste processo, me proporcionando calma e sabedoria para sempre fazer as melhores escolhas e por ter me dado a oportunidade de vir para o Brasil, um país tão rico culturalmente que me recebeu de braços abertos.

À UNESP/FCAV – Campus de Jaboticabal, por intermédio do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária, pela oportunidade e pelos ensinamentos oferecidos.

Ao professor Everlon Cid Rigobelo, muito obrigado pela orientação, ensinamentos, amizade, respeito em todas as etapas da realização deste trabalho e principalmente pela confiança e paciência nos meus momentos mais conturbados deste processo.

A todos os professores da UNESP/FCAV, pela contribuição na minha formação profissional.

À CAPES pelo auxílio concedido.

À minha mãe, mulher lutadora que sempre confiou, acreditou e nunca desistiu de mim. Ao meu irmão por estar do lado dela e pela confiança. Ao meu pai pelo apoio e pelas orações.

À Yury Tatiana por ter me aberto as portas para vir para o Brasil e por me apresentar a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

À toda equipe e membros do LSM. Ao Assis pelos ensinamentos, colaboração e paciência durante este processo de formação. Á Joviany, Ana Luiza, Taciana, Karime, Roberta, Dinalva, Ana Carolina, Noemi e Rafael pela ajuda, conselhos e amizade.

Às queridinhas Caren, Viviane, Priscila e Lurdinha, obrigado pela amizade maravilhosa de vocês, pelo apoio incondicional, por acreditarem em mim e pelas altas risadas.

Aos demais funcionários, professores e estudantes do prédio da Microbiologia, em especial a Edna e Dona Rô muito obrigado pelo apoio, pelas palavras de carinho e pela força proporcionada através delas.

À República Myzhéria por terem me recebido quando cheguei ao Brasil, pelos dois anos morando com vocês e pelo aprendizado.

As meninas da República Sófadinhas, por serem tão especiais e lindas comigo, Diva, Lorpa, Impina, Breuba, Faroleta e demais meninas, sempre estarão no meu coração.

À Carolina (Shakira), Ángela (Thalia), muito obrigado pelas palavras, pelo apoio, pela confiança, pela amizade incondicional, vocês duas foram muito importantes nesse processo todo e eu só tenho que agradecer.

Aos meus compatriotas colombianos e demais amigos estrangeiros aqui em Jaboticabal, muito obrigado pela amizade.

Ao Cleberson por ter me estendido a sua mão no meu momento mais difícil, por confiar, acreditar e me apoiar junto com a Dona Leiva e Seu Francisco e por terem se tornado a minha segunda família aqui no Brasil.

Aos meus familiares e amigos na Colômbia, muito obrigado pelo apoio e pelas orações.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente estiveram envolvidas e me ajudaram de alguma maneira neste processo, e aos amigos que fiz ao longo dessa jornada, muito obrigado.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Antibióticos.....	4
2.1.1 Antibióticos β -lactâmicos	5
2.1.2 Fluoroquinolonas	7
2.1.3 Aminoglicosídeos.....	8
2.1.4 Antibióticos na produção animal	9
2.1.5 Antibióticos no solo.....	12
2.1.6 Resistência a antibióticos	14
2.2 Solo.....	17
2.2.1 Caracterização do solo	17
2.2.1.1 Latossolos	17
2.2.1.1.1 Latossolo Vermelho	18
2.2.2 Bactérias do solo	19
2.2.3 Microcosmos.....	20
3. OBJETIVO	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Coleta do solo	23
4.2 Processamento das amostras de solo	26
4.3 Capacidade de Retenção de Água (CRA)/Capacidade de Campo	26
4.4 pH.....	26
4.5 Umidade e Matéria Orgânica	27
4.6 Incubação do Solo.....	27
4.7 Método de contagem (UFC).....	28

4.8	Atividade Respiratória Microbiana (ARM)	29
4.9	Atividade Enzimática da Desidrogenase	29
5.	RESULTADOS	30
5.1	Unidades Formadoras de Colônias	30
5.2	Atividade Respiratória Microbiana (ARM)	31
5.3	Atividade Enzimática da Desidrogenase	32
6.	DISCUSSÃO	34
7.	CONCLUSÃO	37
8.	REFERENCIAS	38
	ANEXO 1	45
	ANEXO 2	47
	ANEXO 3	49

IMPACTO DO USO DE ANTIBIÓTICOS NA MICROBIOTA DO SOLO

RESUMO– Devido ao grande número de antibióticos de uso veterinário que estão sendo liberados no solo através da urina e dejetos fecais dos animais de produção, algumas pesquisas têm verificado o impacto desses antibióticos na microbiota do solo. O presente estudo teve como objetivo avaliar o impacto dos antibióticos sobre a microbiota do solo em condições de microcosmos, de um solo de pastagem de bovinos e um solo de floresta, submetidos à presença de três antibióticos utilizados na produção animal, sendo estes, ampicilina, enrofloxacina e estreptomicina, nas concentrações de 0, 30 e 100 mg/kg de solo seco. A concentração de 0 mg/kg foi usada como controle. Os solos foram incubados em frascos de vidro de tampa rosca e mantidos a temperatura ambiente no escuro para reproduzir as condições reais encontradas na natureza. Foram avaliadas atividade respiratória microbiana, atividade da enzima desidrogenase e contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) para estabelecer se existia ou não inibição do crescimento bacteriano nos dias 0, 1, 20 e 35. Os resultados mostram um aumento considerável nas UFC nos solos que receberam a ampicilina em ambas às concentrações durante o primeiro dia com relação ao controle. No dia 35 estas contagens se tornaram semelhantes ao controle ou menores. Os solos que receberam enrofloxacina e estreptomicina tiveram uma contagem menor que o controle inicialmente e com o tempo essas UFC aumentaram. A atividade respiratória microbiana e a atividade da enzima desidrogenase também confirmam esse achado. Esses resultados sugerem que os micro-organismos estão utilizando algum composto da ampicilina para o aumento das colônias e que os outros antibióticos diminuem a população microbiana do solo, especialmente a estreptomicina. Provavelmente alguns micro-organismos estejam sendo selecionados.

Palavras-chave: Antibióticos veterinários, Comunidades microbianas, Microcosmos, Solo

IMPACT OF THE USE OF ANTIBIOTICS IN THE MICROBIAL COMMUNITY OF SOIL

ABSTRACT- Due to the large number of veterinary antibiotics that are being released into the soil through urine and fecal waste of livestock, some research has linked the impact of those antibiotics in soil microflora. In the current study was evaluated the impact of antibiotics in the soil microbial community under microcosms conditions, cattle pasture soil and a forest soil under the presence of three antibiotics used in animal husbandry; ampicillin, enrofloxacin and streptomycin, using a concentration of 0, 30 e 100 mg/kg dry soil. The concentration of 0mg/kg was used as control. The soils were incubated in screw cap glass jars and kept at room temperature in the dark to reproduce actual conditions found in nature. It was evaluated the microbial respiratory activity as well as the activity of dehydrogenase enzyme and colony forming units (CFU) to establish whether there was inhibition of bacterial growth or not at day 0, 1, 20 and 35. The results show a considerable increase in CFU in soils that received both concentrations of ampicillin during the first day compared with control. At day 35 these counting became similar to control or lower. The soils that received enrofloxacin and streptomycin, initially had lower countings than the control and over time these CFU increased. The microbial respiratory activity and the activity of dehydrogenase also confirmed these findings. These results suggest that some microorganisms are using a compound of ampicillin to grow. The other antibiotics decrease the soil microbial population, especially streptomycin. Probably some microorganisms are being selected.

Keywords: Veterinary antibiotics, Microbial community, Microcosms, Soil

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Espectro e mecanismos de ação dos principais tipos de antibióticos.....	5
Tabela 2. Terceiro nível categórico do SiBCS, Latossolo Vermelho.....	19
Tabela 3. Valores das médias das unidades formadoras de colônia dos fatores principais; antibiótico, concentração e tempo no solo de pastagem.....	45
Tabela 4. Valores das médias das Unidades Formadoras de Colônia no solo de pastagem.....	45
Tabela 5. Valores das médias das unidades formadoras de colônia dos fatores principais; antibiótico, concentração e tempo no solo de floresta.....	45
Tabela 6. Valores das médias das Unidades formadoras de Colônia no solo de floresta.....	46
Tabela 7. Valores das médias da atividade respiratória microbiana dos fatores principais; antibiótico, concentração e tempo no solo de pastagem.....	47
Tabela 8. Valores das médias da atividade respiratória microbiana no solo de pastagem.....	47
Tabela 9. Valores das médias da atividade respiratória microbiana dos fatores principais; antibiótico, concentração e tempo no solo de floresta.....	47
Tabela 10. Valores das médias da atividade respiratória microbiana no solo de floresta.....	48

Tabela 11. Valores das médias da desidrogenase dos fatores principais; antibiótico, concentração e tempo no solo de pastagem.....	49
Tabela 12. Valores das médias da desidrogenase no solo de pastagem.....	49
Tabela 13. Valores das médias da desidrogenase dos fatores principais; antibiótico, concentração e tempo no solo de floresta.....	49
Tabela 14. Valores das médias da desidrogenase no solo de floresta.....	50

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Fórmula estrutural da Ampicilina	7
Figura 2. Fórmula estrutural da Enrofloxacina.....	8
Figura 3. Fórmula estrutural da Estreptomicina.....	9
Figura 4. Quantidade em percentagem de antibióticos veterinários vendidos nos Estados Unidos em 2014.....	10
Figura 5. Grupos de antibióticos veterinários mais usados de forma terapêutica em frangos de corte.....	11
Figura 6. (A) cinco maiores consumidores de antimicrobianos na produção animal em 2010. (B) cinco maiores consumidores de antimicrobianos na produção animal em 2030 (projetado). (C) Maior Aumento do consumo de antimicrobianos entre 2010 e 2030. (D) Maior aumento relativo no consumo de antimicrobianos entre 2010 e 2030. CHN, China; EUA, Estados Unidos; BRA, Brasil; DEU, Alemanha; IND, Índia; MEX, México; IDN, Indonésia; MMR, Myanmar; NGA, Nigéria; PER, Peru; PHL, Filipinas.....	12
Figura 7. Destino dos antibióticos veterinários utilizados na indústria pecuária....	13
Figura 8. Latossolo Vermelho.....	18
Figura 9. Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal.....	23
Figura 10. Zona de coleta solo de pastagem de bovinos.....	24
Figura 11. Zona de coleta solo de floresta.....	24

Figura 12. Mapa de solos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal.....	25
Figura 13. Sistema de Microcosmos e Atividade Respiratória Microbiana.....	28
Figura 14. Unidades Formadoras de Colônias nos diferentes tipos de solo e concentrações de antibióticos.....	30
Figura 15. Atividade Respiratória Microbiana nos diferentes tipos de solo e concentrações de antibiótico.....	31
Figura. 16 Atividade da Enzima desidrogenase nos diferentes tipos de solo e concentrações de antibiótico.....	33

1. INTRODUÇÃO

Os fármacos são indispensáveis para a manutenção da saúde pública e a qualidade de vida. Os avanços das pesquisas em terapias com a utilização de antimicrobianos para a manutenção da saúde são essenciais para uma sociedade saudável (CARACCIOLO et al., 2015). Produtos farmacêuticos veterinários previnem, tratam doenças e aumentam a eficiência da produção de alimentos. Milhares de diferentes compostos ativos estão sendo atualmente utilizados em grandes quantidades para tratar ou prevenir doenças na produção animal (MONTEIRO et al., 2010).

Dentro desse grupo de fármacos estão os antibióticos que comumente refere-se a agentes antimicrobianos que visam especificamente ao controle bacteriano. Os antibióticos podem ser produtos naturais, normalmente metabólitos secundários de origem fúngica ou bacteriana, derivados semissintéticos ou totalmente sintéticos. Existem atualmente cerca de 250 diferentes antibióticos registrados para utilização em medicina humana e veterinária (KÜMMERER, 2003, 2009).

Os antibióticos são amplamente utilizados na produção animal para proteger ou curar doenças infecciosas dificultando a propagação de bactérias indesejáveis (REICHEL et al., 2014) e seu uso está estimado em 50.000 – 200.000 toneladas por ano (OK et al., 2011; DU; LIU, 2012; KUMAR et al., 2012). No entanto, de 30-90% dos antibióticos administrados não são digeridos pelos animais, e muitas vezes são excretados como compostos ativos ou metabólitos em ambientes por meio da urina e dejetos fecais (SARMAH et al., 2006). O estrume, ao contrário de dejetos humanos, não sofre tratamento terciário de águas residuais e, conseqüentemente, a concentração de antibióticos disponível no ambiente é maior na produção animal (KIM et al., 2010), podendo chegar ao ambiente de forma direta por animais pastejando ou, indiretamente, por espalhamento de excrementos de animais como fertilizante para solos agrícolas. A intenção real do uso de antibióticos é inibir o crescimento ou matar bactérias e, portanto, há uma séria preocupação quanto aos efeitos qualitativos e quantitativos sobre as populações microbianas residentes no solo, possivelmente, levando a distúrbios no seu funcionamento (ZIELEZNY, 2008).

Os fármacos, contrariamente aos metais pesados e pesticidas, raramente eram vistos como potenciais poluentes ambientais, embora fossem desenvolvidos com a intenção de realizar um efeito biológico e, portanto, eles poderiam ter o potencial de perturbar as populações microbianas naturais (DAUGHTON; TERNES, 1999).

Segundo Sarmah et al. (2006), os antibióticos veterinários que entram nos solos agrícolas através da aplicação de estrume animal e fertilizantes à base de estrume têm sido uma fonte principal deste fármaco nos ambientes circundantes.

Atualmente, a biodiversidade do solo é considerada fundamental para sustentar o funcionamento do ecossistema, sendo que sua biota desempenha um papel fundamental na ciclagem de nutrientes, decomposição de matéria orgânica e na manutenção da fertilidade do solo (ZACCARDELLI et al., 2013).

Considerando a alta liberação de antibióticos veterinários no solo, tem havido um crescente interesse em se conhecer os impactos causados com relação à persistência de antibióticos e seus efeitos sobre os ambientes (JUNWEI et al., 2014).

Impactos negativos nas plantas foram relatados na presença de resíduos de antibióticos (LIU et al., 2009). Efeitos ambientais dos antibióticos têm sido identificados na biomassa microbiana (THIELE-BRUHN; BECK, 2005), atividade microbiana (KLEINEIDAM et al., 2010), e estruturas comunitárias (REICHEL et al., 2013).

Através da detecção de unidades formadoras de colônias (UFCs) Yang et al. (2009) demonstraram que a exposição de solo da rizosfera de trigo a diferentes concentrações de oxitetraciclina afetava altamente a estrutura da comunidade microbiana e as atividades enzimáticas do solo. Em experimento realizado em estufa, Ollivier et al. (2010) investigaram o impacto da sulfadiazina (SDZ), em estrume de porco contaminado, em comunidades microbianas funcionais envolvidas em processos-chave do ciclo do nitrogênio (N) nos complexos de raiz-rizosfera de milho e trevo. Além disso, o desenvolvimento e disseminação de bactérias resistentes a antibióticos têm sido estudados devido à contaminação por estas substâncias (HALLING-SORENSEN et al., 2002). Destinos ambientais, por exemplo dissipação, degradação, transformação, mobilidade, sorção e sequestro, de antibióticos veterinários residuais como sulfamonometoxina (SMM), SDZ, ou clortetraciclina (CTC) em solos após a aplicação são relatados também em investigações recentes (KUMAR et al., 2012; WANG et al 2006).

Apesar dos grandes esforços para elucidar o destino e os efeitos de antibióticos em ambientes de solo, uma grande lacuna de conhecimento ainda existe.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Antibióticos

Os antimicrobianos são compostos naturais, semissintéticos ou sintéticos que podem matar ou inibir o crescimento de micro-organismos incluindo bactérias, archaea, vírus, protozoários, microalgas e fungos. Os "Antibióticos" são um grupo de antimicrobianos especificamente destinados a matar ou inibir o crescimento de bactérias em hospedeiros humanos ou animais, o que os distingue de desinfetantes ou outros microbicidas. Os Antibióticos revolucionaram a medicina humana nos últimos 75 anos e também são amplamente utilizados como medicamentos veterinários e promotores de crescimento animal (BRANDT et al., 2015).

Em 1929, Alexander Fleming observou que um mofo contaminante causava lise em uma cultura de estafilococos. Isolou e cultivou o fungo para comprovar que o caldo onde tinha-se desenvolvido tinha as mesmas propriedades antibacterianas. Por tanto, a substância que esse micro-organismo produziu foi considerado o primeiro antibiótico identificado e que recebeu o nome de penicilina devido ao gênero de fungos do qual era produzido, *Penicillium* (SUMANO; OCAMPO, 2006). A atividade da penicilina era superior à das sulfas, corante utilizado como antimicrobiano, e a demonstração que fungos produziam substâncias capazes de controlar a proliferação bacteriana motivou uma nova frente de pesquisas na busca de antibióticos (OLIVEIRA; DA SILVA; TALLARICO, 2010).

Após o processo de industrialização da penicilina nos anos 40s, especialmente em consequência da Segunda Guerra Mundial (PROJAN; SHLAES 2004), foi observado um rápido crescimento na descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos.

Os antibióticos podem ser classificados em β -lactâmicos, sulfonamidas, tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, quinolonas, fluoroquinolonas, fenícolos entre outros (SUMANO; OCAMPO, 2006). A Tabela 1 descreve o uso e mecanismos de ação das diferentes famílias de antibióticos.

Tabela 1. Espectro e mecanismos de ação dos principais tipos de antibióticos

Tipo de antibiótico	Exemplo	Espectro	Mecanismo de Ação
Aminoglicosídeos	Estreptomicina Gentamicina Neomicina	Gram-negativas	Inibição da síntese de proteínas
β-lactâmicos	Penicilina Cefalosporinas	Amplo espectro	Inibição da síntese de peptidoglicano na parede celular
Fenólicos	Cloranfenicol	Gram-positivas Gram-negativas	Inibição da síntese de proteínas
Macrolídeos	Eritromicina Azitromicina Claritromicina.	Maiormente Gram-positivas	Inibição da síntese de proteínas
Quinolonas	Ciprofloxacina Norfloxacina	Gram-positivas e Gram-negativas	Inibição da DNA girase ou a enzima topoisomerase IV
Fluoroquinolonas	Enrofloxacin	Maiormente Gram-negativas	Inibição da DNA girase ou a enzima topoisomerase II
Sulfonamidas	Sulfametazina Trimetoprim	Gram-positivas Gram-negativas	Inibição da síntese de folato
Tetraciclina	Tetraciclina Clortetraciclina Oxitetraciclina,	Gram-positivas Gram-negativas	Inibição da síntese de proteínas

Adaptado de Adzitey, 2015; Sumano e Ocampo, 2006

Será feita referência aos antibióticos β -lactâmicos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos; famílias dos antibióticos ampicilina, enrofloxacin e estreptomicina respectivamente, usados nesse estudo.

2.1.1 Antibióticos β -lactâmicos

Constituem a primeira classe de derivados de produtos naturais utilizados no tratamento terapêutico de infecções bacterianas. Hoje, várias décadas após a descoberta da penicilina, este grupo ainda contém os agentes mais comumente

utilizados. Possuem amplo espectro de atividade antibacteriana, eficácia clínica e excelente perfil de segurança, uma vez que atuam na enzima transpeptidase, única em bactérias (OLIVEIRA; DA SILVA; TALLARICO 2010). Todos os antibióticos β -lactâmicos tem um elemento estrutural comum, o anel azetidina de quatro membros ou o anel β -lactâmico que é seu centro de ação. Na maioria dos antibióticos, este anel central é fundido com um segundo anel de cinco ou seis membros num processo de biossíntese múltipla para formar as penicilinas e cefalosporinas respectivamente (NUSSBAUM et al., 2006).

Tal como acontece com a maioria dos antibióticos, os β -lactâmicos são tornados inativos contra as bactérias através de três mecanismos primários de resistência. O mecanismo mais comum é a produção de enzimas que degradam ou modificam o antibiótico antes que ele possa atingir o local alvo apropriado. Neste caso, a família de enzimas β -lactamasas degrada os antibióticos β -lactâmicos e são encontradas amplamente disseminadas entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O segundo mecanismo é a alteração do local alvo do antibiótico. Neste caso, as transpeptidases da parede celular resistentes aos β -lactâmicos desempenham este papel, esta é agora uma das principais causas de resistência a vários patógenos. O mecanismo final é a prevenção do acesso do antibiótico ao alvo por meio da alteração da permeabilidade (WILKE; LOVERING; STRYNADKA, 2005)

Dentro desse grupo de antibióticos β -lactâmicos encontra-se a **Ampicilina** (Figura 1), uma aminopenicilina semissintética que age bem contra micro-organismos resistentes a outras penicilinas entre os quais encontramos *E. coli*, *Klebsiella* e *Haemophilus sp.*, mas igual que as penicilinas naturais é susceptível á inativação por lactamasas. É de grande eficácia em infecções respiratórias digestivas e em casos de mastites por micro-organismos gram-negativos (SUMANO; OCAMPO, 2006).

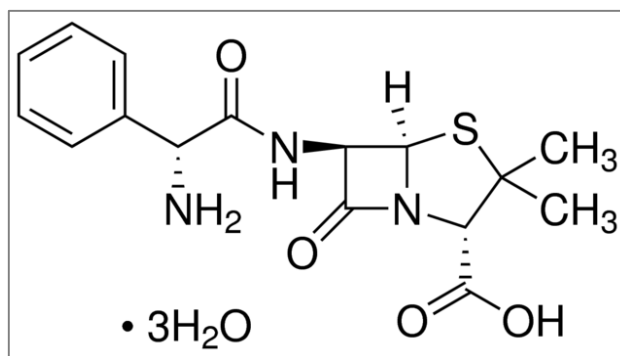


Figura 1. Fórmula estrutural da Ampicilina

Fonte: *sigma-aldrich.com*

2.1.2 Fluoroquinolonas

Como o seu nome sugere, as fluoroquinolonas são derivadas das quinolonas. Sua diferença está na substituição do oitavo átomo de carbono por um átomo de nitrogênio e na adição de um átomo de flúor na sexta posição, dando-lhes ação antibiótica mais potente e um maior espectro de atividade (bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas) que têm sido utilizados na prática médica para o tratamento de infecções graves ou resistentes desde o final da década de 1980, levando-as a uma utilização generalizada em todo o mundo (REDGRAVE et al., 2014). Esses antibióticos têm como alvo duas enzimas relacionadas, DNA-girase e DNA-topoisomerase II. A girase é responsável pela introdução de supercoil negativo no DNA e pelo alívio do estresse esperado da torção, para se acumular à frente dos complexos de transcrição e replicação. A topoisomerase II proporciona uma potente atividade de desvinculação. Tanto a girase quanto a topoisomerase II são enzimas essenciais e, por conseguinte, espera-se que os agentes que as atacam bloqueiem o crescimento bacteriano (DRLICA, 1999).

Nesse grupo de fluoroquinolonas encontra-se a **Enrofloxacin** (Figura 2), antibiótico de amplo espectro, excelente contra gram-negativas e contra algumas bactérias gram-positivas e micoplasmas. Recomenda-se em infecções pulmonares, de pele, urinária digestivas e micoplasmose. Este antibiótico também tem sido utilizado para controlar certos agentes patogênicos intracelulares (SUMANO; OCAMPO, 2006).

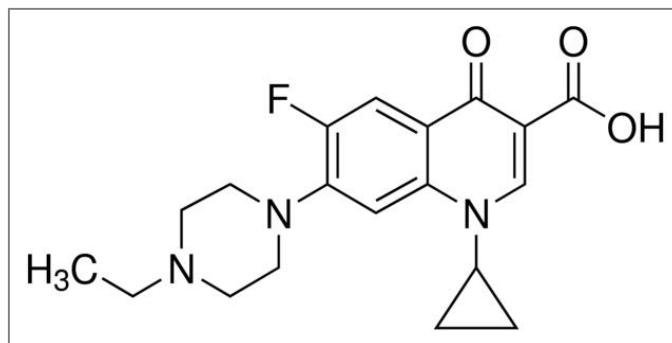


Figura 2. Fórmula estrutural da Enrofloxacina

Fonte: *sigma-aldrich.com*

A seleção da resistência à enrofloxacina ocorre a partir de mutações cromossômicas, a criação de modificações na enzima girase ou alterações na permeabilidade. Nenhuma resistência plasmídica foi demonstrada. Os mutantes podem desenvolver resistência a outras fluoroquinolonas e antimicrobianos, incluindo cefalosporinas, cloranfenicol e tetraciclina (MITCHELL, 2006).

2.1.3 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são carboidratos hidrofílicos, policatiónicos, que contêm amina e são geralmente por três a cinco anéis. A maioria dos aminoglicosídeos são produtos naturais ou derivados de actinomicetos do solo (CRAIG; STITZEL, 2004). Sua história começa em 1944 com a estreptomicina e foi marcada posteriormente pela sucessiva introdução de uma série de compostos que estabeleceu definitivamente a utilidade desta classe de antibióticos para o tratamento de infecções bacilares gram-negativas. Na década de 1970, os aminoglicosídeos semissintéticos demonstraram a possibilidade de obter compostos que eram ativos contra estirpes que haviam desenvolvido mecanismos de resistência para aminoglicosídeos anteriores, bem como exibindo perfis toxicológicos distintos (MINGEOT-LECLERCQ; GLUPCZYNSKI; TULKENS, 1999).

Os aminoglicosídeos são mais eficazes contra micro-organismos que se multiplicam rapidamente e destroem bactérias por vários mecanismos. Eles precisam apenas de um curto contato com as bactérias para matá-las e, como tal, são dependentes da concentração em suas ações. O seu principal local de ação é o ribossomo bacteriano associado à membrana através do qual interferem com a

síntese de proteínas. Muitos mecanismos de resistência a aminoglicosídeos tem sido descritos que podem ser mediados cromossomicamente ou por plasmídeos (MERCK).

A **Estreptomicina** (Figura 3) faz parte dos aminoglicosídeos e foi descoberta logo após a introdução da penicilina na medicina, sendo o segundo maior antibiótico útil terapêuticamente. Proporcionou a primeira cura efetiva para tuberculose, meningite tuberculosa e uma série de outras infecções causadas por bactérias patogênicas Gram-negativas (WAINWRIGHT, 1991).

A estreptomicina reage contra micobactérias, gram-negativas, *Leptospira, sp.*, *Francisella tularensis* e *Yersinia pestis*. É efetiva contra alguns poucos micoplasmas e algumas espécies de estafilococos. É utilizada no tratamento de leptospirose bovina ou porcina, enterites bacterianas e outras infecções sistêmicas. Já que continua sendo de grande utilidade contra a tuberculose nos humanos, deve-se cuidar que seu uso seja racional na medicina veterinária (SUMANO; OCAMPO, 2006).

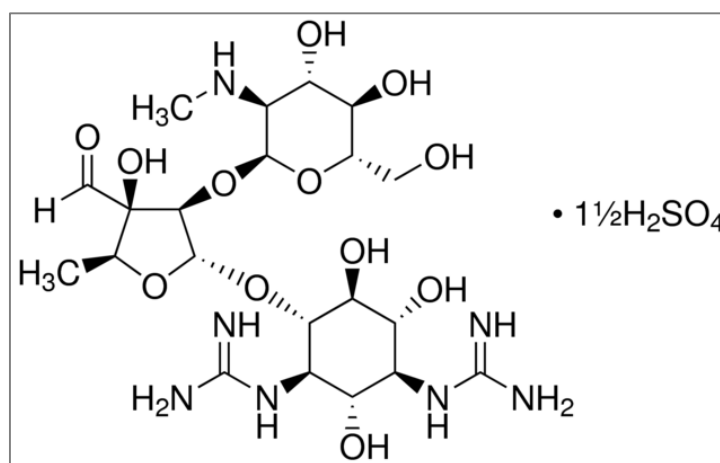


Figura 3. Fórmula estrutural da Estreptomicina

Fonte: sigma-aldrich.com

2.1.4 Antibióticos na produção animal

Os efeitos benéficos dos antibióticos na produção animal foram descobertos em 1950 e por tanto têm sido usados por mais de 60 anos na alimentação do gado (TASHO; CHO, 2016). Desde então, o uso de antibióticos na alimentação animal tornou-se uma tendência global disparada pela crescente dependência da agricultura

industrial para produzir alimentos. Mais de 150 antibióticos estão em uso hoje, dos quais >90% são produtos naturais de bactérias, fungos e modificações semissintéticas de compostos naturais, e alguns que são totalmente sintéticos (NUSSBAUM et al., 2006). Esses fármacos são administrados aos rebanhos para ser usados como terapia, prevenir e controlar doenças e como promotores de crescimento.

De acordo ao estudo feito por Wang e Tang (2010), a quantidade do uso anual de antibióticos, incluindo antibióticos para saúde humana e veterinária, alcançou 100.000–200.000 toneladas em total ao redor do mundo, mas são poucos os países que dispõem de estatísticas precisas a respeito das quantidades de fármacos veterinários utilizados nas criações animais (DÍAZ-CRUZ; BARCELÓ, 2007). No entanto, estima-se que mais de 70% desses compostos sejam agentes antibióticos (THIELE-BRUHN, 2005).

Só nos Estados Unidos no ano de 2014 foram vendidas mais de 15 toneladas de antibióticos veterinários (Figura 4). Também houve um incremento de 20% nas vendas desses fármacos desde o ano 2009 até 2014 (FDA, 2015).

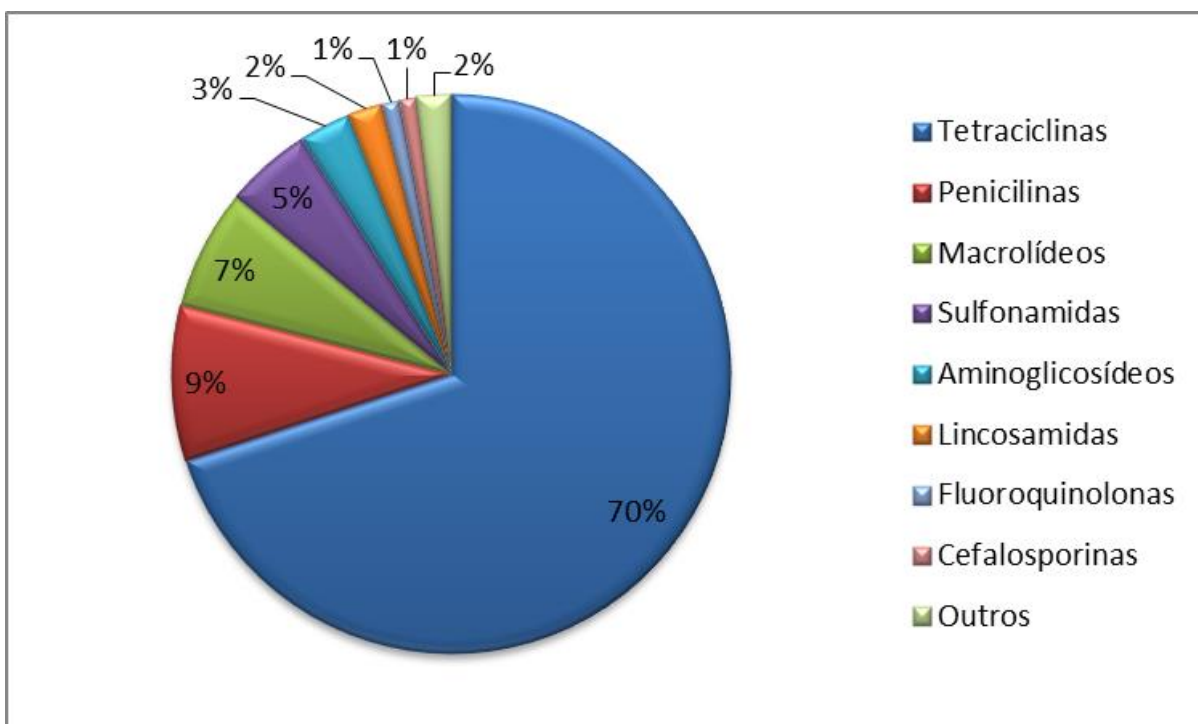


Figura 4. Quantidade em porcentagem de antibióticos veterinários vendidos nos Estados Unidos em 2014

Fonte: FDA, 2015.

No Brasil, não existem estatísticas em relação à quantidade de antibióticos comercializada para a produção animal. Entre as poucas fontes de informações existentes, a Secretaria de Estado da Saúde do Paraná realizou um estudo qualitativo sobre a comercialização de medicamentos veterinários em frangos de corte, o qual revelou o uso de 126 produtos comerciais, com 49 diferentes princípios ativos. A Figura 5 mostra os grupos de antibióticos veterinários mais usados de forma terapêutica no referido estudo (BORGES; MARQUES, 2010).

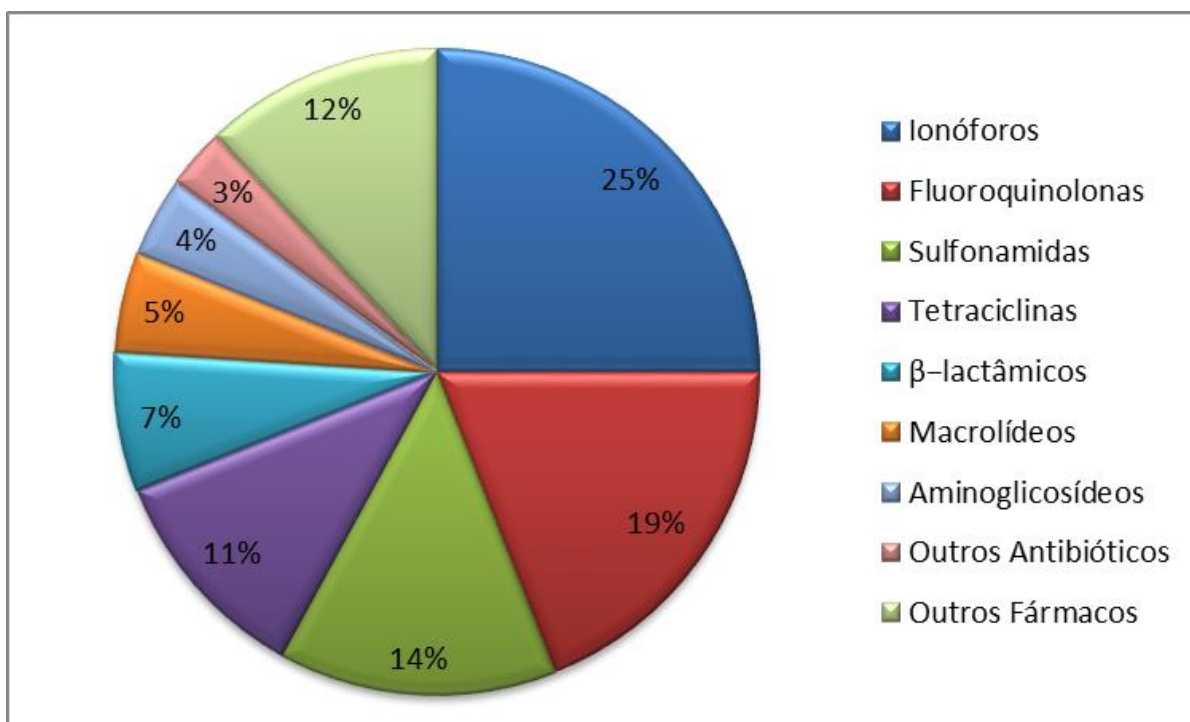


Figura 5. Grupos de antibióticos veterinários mais usados de forma terapêutica em frangos de corte

Fonte: Borges; Marques, 2010.

Para o ano 2030, espera-se um alarmante incremento de 67% no consumo de antibióticos na produção animal. Em 2010, os cinco países com maior participação no consumo mundial de antimicrobianos na produção animal foram China (23%), Estados Unidos (13%), Brasil (9%), Índia (3%) e Alemanha (3%). Em 2030, este ranking é projetado para serem China (30%), Estados Unidos (10%), Brasil (8%), Índia (4%) e México (2%). Entre os 50 países com maiores quantidades de antimicrobianos utilizados na pecuária em 2010, os cinco países com maiores aumentos percentuais projetados de consumo de antimicrobianos até 2030 são provavelmente Myanmar

(205%), Indonésia (202%), Nigéria (163%), Peru (160%) e Filipinas (157%). A China e o Brasil estão entre os maiores consumidores de antimicrobianos atualmente, mas não são os países com o aumento mais rápido projetado no consumo de antimicrobianos. Isso indica que esses dois países já iniciaram uma mudança em direção a sistemas de produção de gado mais intensificados usando antimicrobianos para manter a saúde animal e aumentar a produtividade (Figura 6) (BOECKEL et al., 2015).

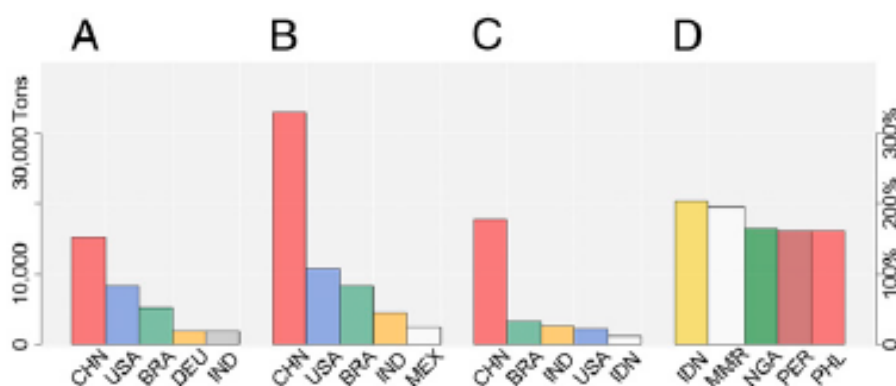


Figura 6. (A) cinco maiores consumidores de antimicrobianos na produção animal em 2010. (B) cinco maiores consumidores de antimicrobianos na produção animal em 2030 (projetado). (C) Maior Aumento do consumo de antimicrobianos entre 2010 e 2030. (D) Maior aumento relativo no consumo de antimicrobianos entre 2010 e 2030. CHN, China; EUA, Estados Unidos; BRA, Brasil; DEU, Alemanha; IND, Índia; MEX, México; IDN, Indonésia; MMR, Myanmar; NGA, Nigéria; PER, Peru; PHL, Filipinas (BOECKEL et al., 2015).

O reconhecimento dos antibióticos usados na agricultura como um dos maiores contribuintes ao desenvolvimento de organismos resistentes é muito importante (TASHO; CHO, 2016).

2.1.5 Antibióticos no solo

Solos agrícolas e águas subterrâneas servem como reservatórios principais de antibióticos residuais. Na produção animal, os antibióticos podem chegar ao ambiente por meio das companhias farmacêuticas, resíduos do processo de fabricação dos medicamentos (ZHANG; LI, 2011), diretamente das excreções dos animais em pastejo ou, podem ser indiretamente disseminados pela aplicação de esterco animal no solo

(BLACKWELL et al., 2007). Existe a possibilidade também, de que os antibióticos abranjam o ambiente pela disposição final de medicamentos não usados ou fora da validade, mas não parece ser uma das fontes principais de contaminação. (BOXALL et al., 2003). Segundo Sarmah et al. (2006), até 95% dos princípios ativos dos antibióticos podem ser excretados pelos animais sem sofrer nenhum tipo de metabolização. Thiele-Bruhn e Beck (2005) afirmam que quando o fármaco é em grande parte metabolizado, alguns metabolitos e produtos da degradação, podem ser excretados. É importante ressaltar que a quantidade de antibióticos que vai ser eliminada pelo animal depende do tipo de substancia, dosagem, tempo de tratamento, espécie, idade, entre outros fatores (KEMPER, 2008). Os antibióticos residuais encontram seu caminho no solo de onde eles chegam ao ecossistema aquático e, posteriormente, às plantas (Figura 7) (TASHO; CHO, 2016).

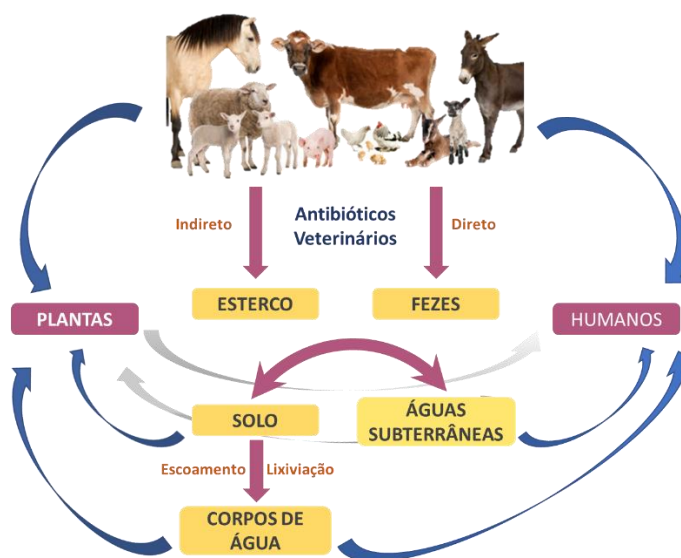


Figura 7. Destino dos antibióticos veterinários utilizados na indústria pecuária
Adaptado de Tasho; Cho, 2016.

Uma vez no solo, os antibióticos interagem com a fase sólida dele e são propensos à transformação microbiana. Depois há um grande potencial de transferência desses antibióticos desde o solo à atmosfera, hidrosfera e biosfera. O escoamento superficial e o transporte facilitado pelas partículas podem dispersar os antibióticos no ambiente junto com a lixiviação na água subterrânea (JECHALKE et al., 2014).

Muitos dos princípios ativos dos antibióticos usados na produção animal não foram ainda investigados quanto ao seu potencial de atingir o ambiente, seu comportamento e possível impacto (DÍAZ-CRUZ et al., 2003; BOXALL et al., 2003). Também pouco se sabe sobre as relações dose-resposta e potenciais limiares de concentração de antibióticos no solo, e estes parâmetros devem ser determinados em estudos futuros para diferentes tipos de solo, sistemas de criação animal e rotações de culturas para permitir a avaliação dos riscos e seus efeitos a curto e longo prazo (JECHALKE et al., 2014).

2.1.6 Resistência a antibióticos

A organização para o bem-estar de animais de granja 'Compassion in world farming' no seu reporte 'Antibióticos em animais de produção, saúde pública e bem-estar animal' (2011), ressalta que a resistência aos antibióticos que está se desenvolvendo globalmente em bactérias patogênicas é uma das principais ameaças à medicina humana. Isso leva a encargos adicionais nos sistemas de saúde, a falhas de tratamento e, no pior dos casos, à infecções intratáveis ou infecções tratadas tarde demais para salvar vidas. Embora o excesso de uso de antibióticos na medicina humana seja a principal causa da atual crise de resistência aos antibióticos, especialistas em saúde pública concordam que o uso excessivo de antibióticos na produção animal intensiva também é um fator importante já que metade da produção mundial de antibióticos é utilizada em animais de criação.

Na produção intensiva de suínos e aves, os animais são mantidos confinados em condições de superlotação, geralmente sem acesso ao exterior, e são criados e manejados para obter o máximo rendimento (crescer mais rapidamente ou produzir mais carne, leite, ovos ou prole). Estas condições comprometem a sua saúde e as suas respostas imunológicas e incentivam o desenvolvimento de doenças infecciosas que se espalham facilmente. Sem a ajuda de drogas para a prevenção dessas doenças, não seria possível manter a produtividade dos animais nas condições intensivas em que são frequentemente mantidos.

O tratamento terapêutico de animais individuais doentes com antibióticos é muitas vezes essencial. Alivia o sofrimento e os devolve à produção econômica. Mas, durante o século XX, o uso de antibióticos em animais de granja rapidamente se expandiu para incluir usos que são, em maior ou menor grau, não terapêuticos. Os usos não terapêuticos permitiram controlar a propagação de infecções nas granjas industriais até uma extensão que não era possível antes e também para estimular o crescimento e a produtividade de forma não natural. Segundo a OIE (2011), os usos veterinários dos antibióticos são classicamente classificados em:

Tratamento de doenças (uso terapêutico): Se alguns animais são encontrados doentes, muitas vezes todo o rebanho será tratado (metafilaxia) para evitar a propagação da doença. Assim, nem sempre existe uma clara distinção entre tratamento e prevenção. O tratamento ocorre normalmente em doses elevadas durante um período relativamente curto de tempo.

Prevenção de doenças (profilaxia). É o tratamento de animais com doses baixas e sub-terapêuticas de antibióticos em alimentos ou água potável quando não mostram sinais de doença, mas pensa-se que existe um risco de infecção. O tratamento pode ser durante um período de várias semanas, e às vezes durante mais tempo.

Promotores de crescimento (não é mais permitido na União Europeia, mas ainda é comum na América do Norte e em outros países). Doses sub-terapêuticas muito baixas de antibióticos são dadas aos animais no alimento, para aumentar a taxa de crescimento e produtividade. O tratamento é contínuo e pode durar uma grande parte da vida do animal.

Embora o uso de antibióticos "promotores de crescimento" seja distinto do uso "profilático" de antibióticos, ele também tem o efeito de suprimir doenças infecciosas que se apresentariam pelas condições da fábrica. Além disso, as dosagens às quais os antibióticos são alimentados para profilaxia são frequentemente suficientemente baixas para terem um efeito promotor do crescimento. Assim, nem sempre existe uma

distinção clara entre o uso de antibióticos para a "promoção do crescimento" e para a prevenção de doenças.

A resistência aos antibióticos tem sido descrita como "o exemplo mais conhecido da rápida adaptação de bactérias a um novo ecossistema". Cada vez que uma pessoa ou animal recebe uma dose de antibióticos há uma oportunidade para que as bactérias resistentes a essa droga sejam selecionadas. A resistência aos antibióticos pode ocorrer através da multiplicação de bactérias que têm uma mutação natural específica que confere resistência ao antibiótico ou pela transferência 'horizontal' de genes entre bactérias. As bactérias podem apresentar resistência a vários antibióticos diferentes. A transmissão horizontal de genes é agora reconhecida como uma das principais causas do aumento da resistência aos antibióticos. Ocorre através de processos naturais de transferência de genes entre células, muitas vezes através de segmentos móveis de DNA conhecidos como transposons e plasmídeos. Os plasmídeos podem transportar vários genes dando resistência a vários antibióticos diferentes de uma vez só.

A resistência aos antibióticos pode ser transmitida dos animais as pessoas através de contato direto com animais infectados: trabalhadores nas granjas e matadouros; consumo de comida contaminada com bactérias resistentes e a través do meio ambiente na água, solo e ar.

2.2 Solo

2.2.1 Caracterização do solo

O solo é composto por três fases: sólida (composta por partículas minerais, raízes de plantas, populações de organismos macro e microscópicos, com metabolismo ativo ou dormente e matéria orgânica), líquida (água com elementos dissolvidos) e gasosa (gases da atmosfera com diferentes proporções). A parte sólida geralmente representa aproximadamente 50% do volume total, dos quais 5% estão representados pela matéria orgânica e o espaço poroso (fase líquida e gasosa) que representa o outro 50%. As três fases podem variar de acordo com o tipo de solo e as condições ambientais (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Oliveira; Jacomine; Camargo (1992) descrevem cinco fatores de formação do solo que interferem direta ou indiretamente na sua estrutura: clima, relevo, seres vivos, material de origem e tempo. Cada solo é o produto do efeito de todos os seus fatores de formação. Ainda de acordo com os autores atributos morfológicos também devem ser levados em conta na classificação como: textura, cor, consistência, estrutura, cerosidade, nódulos e concreções e transição entre horizontes. Características dos solos variam consideravelmente de um lugar para outro. Essas variações estabeleceram sistemas de classificação em que o solo é considerado como uma composição de grande número de solos isolados (BRADY, 1989). As principais classes de solos encontrados no Brasil são: Argilosos, Cambissolos, Latossolos, Luvisolos, Neossolos, Planossolos, Plintossolos e Vertissolos (SILVA; SILVA; CAVALCANTI, 2005). No nosso caso o solo utilizado foi um latossolo vermelho escuro eutrófico.

2.2.1.1 Latossolos

Segundo o site da Agência Embrapa de Informação Tecnológica os latossolos são solos de intemperização intensa chamados popularmente de solos velhos, sendo definidos pelo SiBCS (Embrapa, 2006) pela presença de horizonte diagnóstico latossólico e características gerais como: argilas com predominância de óxidos de ferro, alumínio, silício e titânio, argilas de baixa atividade, fortemente ácidos e baixa

saturação de bases. Também apresenta normalmente baixa fertilidade, exceto quando originados de rochas mais ricas em minerais essenciais às plantas, acidez e teor de alumínio elevados. Possuem boas condições físicas para o uso agrícola, associadas a uma boa permeabilidade por serem solos bem estruturados e muito porosos. Porém, devido aos mesmos aspectos físicos, possuem baixa retenção de umidade, principalmente os de textura mais grosseira em climas mais secos.

2.2.1.1.1 Latossolo Vermelho

Segundo a Embrapa, apresenta cores vermelhas acentuadas, devido aos teores mais altos e à natureza dos óxidos de ferro presentes no material originário em ambientes bem drenados, e características de cor, textura e estrutura uniformes em profundidade (Figura 8). São identificados em extensas áreas nas regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste do país, sendo responsáveis por grande parte da produção de grãos, pois ocorrem predominantemente em áreas de relevo plano e suave ondulado, propiciando a mecanização agrícola. Em menor expressão, podem ocorrer em áreas de relevo ondulado.



Figura 8. Latossolo Vermelho

Disponível em: <http://www.pedologiafacil.com.br/curiosidade.php>
Acesso: 02/01/2017

Na tabela 2 está relacionada a classificação dos latossolos vermelhos no terceiro nível categórico do SiBCS (Embrapa, 2006) onde são descritas as características destas classes de solo e as implicações para uso e manejo.

Tabela 2. Terceiro nível categórico do SiBCS, Latossolo Vermelho.

Teceiro nível	Características
Perféricos	Altos teores de ferro; baixos teores de nutrientes nos solos indicando a necessidade de adubação e correção da acidez para o uso agrícola.
Acriféricos	Altos teores de ferro; baixos teores de nutrientes nos solos indicando a necessidade de adubação e correção da acidez para o uso agrícola.
Ácricos	Pobreza nutricional, sendo necessário adubação e correção da acidez para o uso agrícola.
Aluminoféricos	Solos de baixa fertilidade; toxidez de alumínio e alto teor de ferro.
Distroféricos	Solos de baixa fertilidade e altos teores de ferro.
Distróficos	Solos de baixa fertilidade.
Eutroféricos	Solos de alta fertilidade e com altos teores de ferro.
Eutróficos	Solos de alta fertilidade.

http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/solos_tropicais/arvore/CONT000fzyjaywi02wx5ok0q43a0r9rz3uhk.html
Acesso: 03/01/2017

2.2.2 Bactérias do solo

A capacidade das bactérias em se multiplicar é de extrema importância para os solos. Através da multiplicação essas bactérias conseguem ajustar rapidamente suas atividades quanto às mudanças ambientais. Bactérias variam em seu formato, as predominantes nos solos são as em forma de bastões. No solo o número de bactérias é variável, principalmente pelo fato de diversos fatores interferirem no seu crescimento e desenvolvimento (BRADY, 1989).

Os procaríotos (Bactérias e Arqueias) têm a capacidade de se propagar por quase todos os ambientes do solo, devido principalmente ao seu tamanho e sua capacidade de desenvolverem fases de ociosidade extremamente resistentes.

(BRADY; WEIL,2013). Segundo Brady (1989), o número de bactérias presentes no solo é variável devido a diversos fatores que influenciam sua multiplicação, na maioria das vezes encontram-se nos horizontes de superfície pelo fato de serem mais favoráveis as condições de aeração, umidade, temperatura e alimentação. Esses micro-organismos podem ser autotróficos ou heterotróficos, sendo a maioria das bactérias do solo heterotróficas onde sua fonte energia deriva da matéria orgânica. São responsáveis juntamente com os fungos pela degradação geral da matéria orgânica do solo. Participam de quase todas as reações orgânicas que caracterizam um solo saudável, as bactérias são responsáveis pela oxidação do nitrogênio, oxidação do enxofre e fixação do nitrogênio auxiliando na nutrição das plantas (BRADY; WEIL, 2013; BRADY, 1989).

A presença de um microrganismo no solo é estabelecida pelas condições ambientais dominantes e dos limites da sua equipagem genética. A sua permanência depende da rapidez das respostas fisiológicas em relação às condições ambientais. Alguns micro-organismos conseguem sobreviver em condições de salinidade, pressão, pH e temperaturas extremas. A capacidade de adaptação dos micro-organismos faz com que limitações físicas (aeração, água, adesão, porosidade, etc.) e limitações químicas (disponibilidade de nutrientes, toxicidade, etc.) sejam ultrapassadas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

2.2.3 Microcosmos

Os ecossistemas ao ar livre são muito complexos e difíceis de serem delimitados, os meios científicos de experiência e controle ficam cada vez mais difíceis de serem estudados, com isso muitas pesquisas estão sendo realizadas dentro do próprio laboratório em sistemas denominados microcosmos, onde as condições de campo com limites definidos são imitadas e cuja manipulação e repetição pode ser feito da maneira que se deseja (ODUM, 2001). Microcosmos ou pequenos mundos autocontidos, sejam em garrafas ou outros recipientes podem simular em versão miniatura a natureza dos ecossistemas, esses recipientes recebem o nome de micro ecossistema e utiliza o microssistema (o mundo natural) como base de referência. Dois tipos de microcosmos de laboratório podem ser diferenciados: 1. Micro

ecossistema derivados diretamente da natureza por semeadura múltipla de meios de cultura com amostras ambientais; 2. Sistemas construídos adicionando-se espécies de culturas puras ou não contaminadas até que se obtenha as combinações desejadas. O primeiro sistema representa a natureza simplificada para organismos que sobrevivem por longos períodos no limite dos recipientes, do ambiente de luz e temperatura imposto (ODUM; BARRET, 2007). No segundo sistema adicionando componentes previamente isolados e estudados, tem se o estudo da interação entre as espécies (ODUM, 2001). O sistema microcosmos pode sugerir hipóteses e mecanismos que podem ser testados em manipulações de campo a longos prazos (KREBS, 2009).

3. OBJETIVO

Avaliar o impacto dos antibióticos sobre a microbiota do solo em condições de microcosmos, de um solo de pastagem de bovinos e um solo de floresta, submetidos à presença de três antibióticos utilizados na produção animal sendo estes a ampicilina, enrofloxacina e estreptomicina, usando três concentrações por quilograma de solo (0 mg/kg, 30 mg/kg e 100 mg/kg) em diferentes períodos de incubação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta do solo

Os solos usados nessa pesquisa foram: solo de pastagem de bovinos e solo de floresta, pertencentes à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, campus de Jaboticabal (Figura 9). O solo foi coletado a uma profundidade de 0 a 20 centímetros e antes da coleta o local foi previamente limpo retirando-se o material vegetal existente.

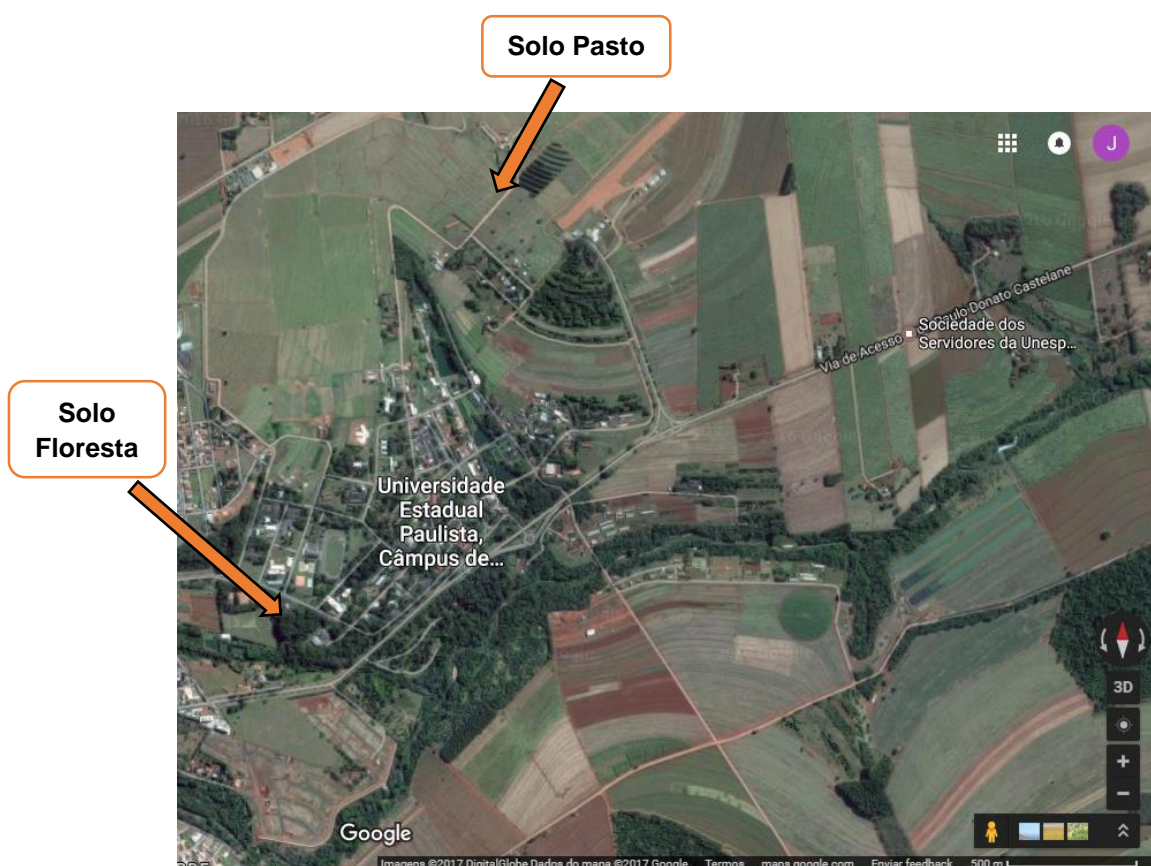


Figura 9. Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal.

Fonte: Google Earth

O solo de pastagem foi coletado na área de recria e terminação de bovinos de corte da raça Nelore e a espécie de pasto é *Brachiaria brizantha marandu* (Figura 10). O solo de floresta foi coletado numa pequena área do lado do prédio da biblioteca do campus (Figura 11).

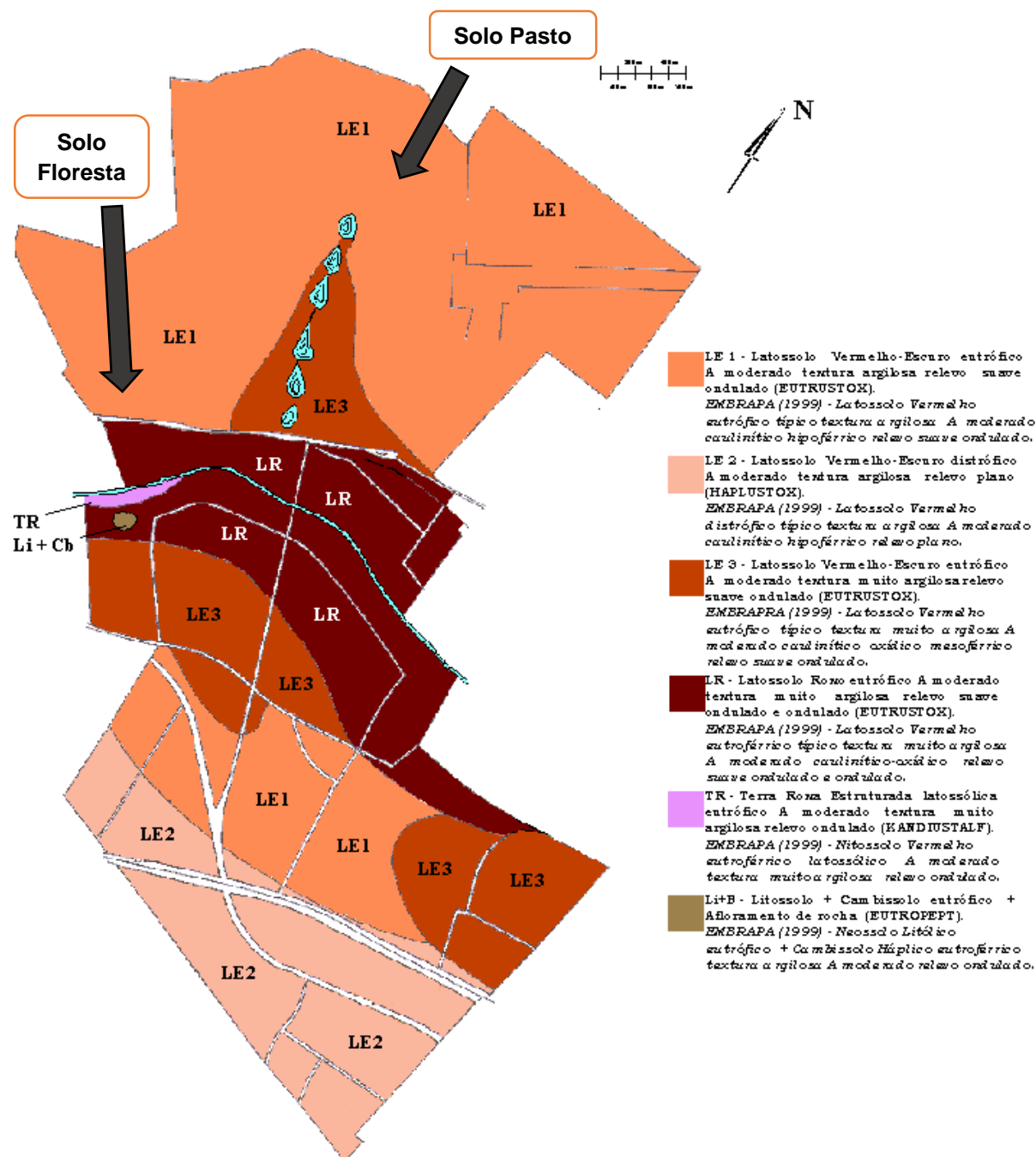


Figura 10. Zona de coleta solo de pastagem de bovinos



Figura 11. Zona de coleta solo de floresta

Os dois tipos de solo são classificados como Latossolo Vermelho eutrófico típico, textura argilosa a moderado, caulínítico hipoférrico, relevo suave ondulado (Figura 12).



ANDRIOLI, I. CENTURION, J.F. Levantamento detalhado dos solos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal. CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 27, Brasília, 1999. Anais. Brasília, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1999. 32p. (T025-3 CD-ROM).

Figura 12. Mapa de solos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal.

Disponível em: <http://javalí.fcav.unesp.br/Home/departamentos/soloseadubos/mapadesolos.gif>

Acesso: 05/12/16

4.2 Processamento das amostras de solo

Após as coletas as amostras foram transportadas para o Laboratório de Microbiologia do Solo da FCAV - Unesp Jaboticabal, onde foram secas (Terra Fina Seca ao Ar - TFSA), e peneiradas em peneira de malha N°12 para retirada de resíduos (pedregulho, capim seco, material vegetal etc.). Posteriormente as amostras foram armazenadas em temperatura ambiente até sua utilização.

4.3 Capacidade de Retenção de Água (CRA)/Capacidade de Campo

Foi utilizado o solo seco ao ar (TFSA) peneirado, o recipiente para a determinação da capacidade de campo foi pesado (Peso 1), em seguida o solo foi colocado no recipiente e foi novamente pesado (Peso 2). O recipiente foi imerso em um frasco contendo água de modo a alcançar a metade da altura do recipiente e foi deixado até umedecer a superfície do solo nele. Aguardaram-se alguns minutos após ter observado a umidade na superfície. O recipiente foi retirado da água e colocado sobre papel absorvente para escorrer a água por 24 h. O mesmo foi tampado com papel de alumínio para evitar a evaporação da água. O recipiente foi pesado novamente após as 24 horas sem o papel alumínio (Peso 3).

4.4 pH

Para a determinação do pH, seguiu-se o protocolo descrito por Raij et al (1987); onde foram utilizadas 10 gramas de solo seco ao ar (TSFA), peneirado em peneira de malha N° 12, a esse foi adicionado 25 ml de H₂O ou solução de CaCl₂ 0,01M; aguardou-se 15 minutos para molhar a amostra. A solução após o período de espera foi agitada por 10 minutos em agitador de hélice individual ou mesa giratória; posteriormente a solução ficou em repouso por 30 minutos. Foi realizada a leitura sem agitar introduzindo-se a ponta do eletrodo na parte do solo. Anotou-se o valor.

4.5 Umidade e Matéria Orgânica

Para determinar a umidade e matéria orgânica seguiu-se o método de estufa descrito por Raij et al. (1987). Foi pesado um cadinho de porcelana, posteriormente foi colocada a amostra de solo úmida e o cadinho mais a amostra úmida de solo foram pesados novamente. O cadinho mais o solo foram colocados em estufa a 98°C-105°C por 24 horas, após as 24h o cadinho foi retirado da estufa e foi colocado imediatamente em dissecador com sílica indicadora de umidade; após resfriamento foi pesado o cadinho mais a amostra seca. O teor de umidade foi determinado pela diferença de peso (cadinho + solo seco) menos o peso do cadinho sem amostra. Foram obtidos os valores de solo úmido e solo seco (%umidade= (solo úmido – solo seco) x 100/solo úmido). Posteriormente foi colocado o cadinho mais a amostra seca em estufa “mufla” a 500°C por 24 horas; após as 24 horas a mufla foi desligada e foi aguardado até essa atingir em torno de 100°C; foi retirado o cadinho da mufla e foi colocado imediatamente em dissecador com sílica indicadora de umidade. Após resfriamento, foi pesado o cadinho mais o solo queimado. Efetuou-se o cálculo cadinho com solo queimado menos cadinho com solo =solo queimado. Tem-se Matéria orgânica (MO), $MO \text{ g/kg} = (\text{Solo seco} - \text{solo queimado}) \times 1000/\text{solo seco}$.

4.6 Incubação do Solo

A incubação do solo com os três tipos de antibióticos (ampicilina, enrofloxacina e estreptomicina) e as diferentes dosagens (0 mg/kg, 30 mg/kg e 100 mg/kg) foi realizada em condições de microcosmos que teve como objetivo reproduzir as condições reais encontradas na natureza. Uma porção de 150 gramas do solo de pasto e solo de floresta foi misturada com os antibióticos e incubados em microcosmos, em vidros de tampa rosca e armazenados em temperatura ambiente mantidos no escuro.

Foram utilizados 35 frascos para cada tipo de solo, 30 para o adcionamento dos antibióticos mais cinco controles (0mg/kg), os quais receberam cada um 150

gramas do solo. Foram realizadas cinco repetições de cada uma das concentrações dos três antibióticos utilizados.

Os frascos contendo solo de pastagem e solo de floresta receberam 70% da sua capacidade de retenção de água (CRA) por meio de uma solução de água esterilizada e concentrações definidas de cada um dos três antibióticos. Os frascos contendo as amostras de solo que serviram como controles receberam a CRA só com água destilada. Após as inoculações os solos de pastagem e floresta foram deixados à temperatura ambiente no escuro. Foi realizada a contagem de UFC/g de solo em diferentes períodos de tempo (1, 20 e 35 dias).

Em cada frasco de vidro foram colocados dois béqueres, um com 20 ml de água destilada e outro com 20 ml de NaOH 1M, para estabelecer a atividade respiratória do solo depois de quatro períodos de tempo (1, 7, 20 e 35 dias) (Figura 13).



Figura 13. Sistema de Microcosmos e Atividade Respiratória Microbiana

4.7 Método de contagem (UFC)

Foi realizada uma contagem inicial, sem adição de nenhum tipo de antibiótico no tempo zero (0). As outras contagens foram realizadas no 1º, 20º e 35º dia após a adição dos antibióticos em cada tipo de solo.

Aproximadamente 10 gramas de cada frasco foram retiradas e levadas à agitação em uma solução de pirofosfato 0,1% por 30 minutos. Para a contagem do número de bactérias totais utilizou-se a técnica de diluição seriada, descrita por Wollum (1982), utilizando como meio de cultura o Standard Agar. Todos os

tratamentos foram realizados em triplicata. Populações bacterianas foram expressas numa base de peso seco do solo.

4.8 Atividade Respiratória Microbiana (ARM)

A atividade respiratória microbiana foi determinada em 150 g de solo seco, inserido em recipiente de vidro com capacidade para 2,5 L, conforme metodologia proposta por Jenkinson & Powlson (1976), com adaptações, com a umidade do solo (solução de antibióticos) ajustada para 70% da capacidade de retenção de água (CRA). Cada recipiente recebeu em seu interior 2 béqueres de 50 mL, um contendo 20 mL de H₂O destilada e outro 20 mL de solução de hidróxido de sódio 1M. Os recipientes foram vedados com filme plástico PVC, tampa, e incubados em sala com ausência de luz a temperatura ambiente. Após os diferentes períodos de incubação (1, 7, 20 e 35 dias), foi retirado o béquer com hidróxido de sódio 1M, adicionado no mesmo 2 mL de solução de cloreto de bário 30%, três gotas de solução de fenolftaleína 1%, e titulado com solução de ácido clorídrico 1M, até a viragem de cor rosa para branco leitoso. Para cada tipo de solo foram utilizados três controles que receberam só água destilada ao invés da solução de antibióticos e três 'brancos' somente com hidróxido de sódio 1M e o béquer com água destilada, sem solo.

4.9 Atividade Enzimática da Desidrogenase

Para avaliação da atividade da desidrogenase seguiu-se o método de Casida (1964), utilizando 3 g de terra fina seca ao ar em tubo de ensaio de 18x180mm adicionando 0,03 g de CaCO₃ e uma solução aquosa de TTC 3% (Trifenil Tetrazolium Cloreto de Sódio) e acrescentou-se 1,3 ml de água destilada ou o suficiente para que houvesse um filme de líquido na superfície do solo. Após a mistura, tampou-se os tubos com um papel de filme plástico e incubou-se em banho maria a 37°C por 24 horas. Após esse período a amostra foi diluída com metanol para a extração de todo o TFF (Trifenilformazan) transformado com até 30 ml de metanol filtrado em papel de filtro Whiteman #2. Posteriormente fez-se a leitura em Abs 485 nm.

5. RESULTADOS

5.1 Unidades Formadoras de Colônias

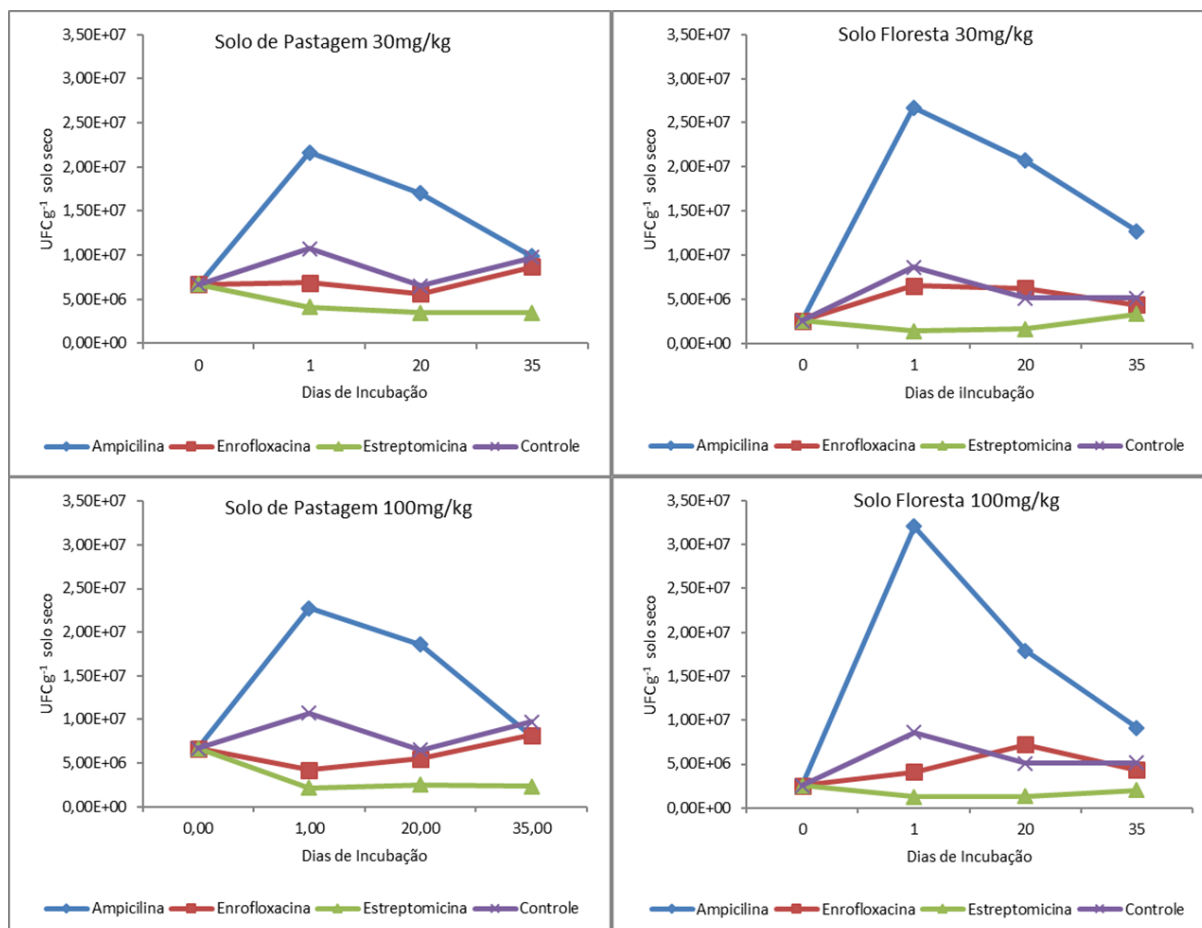


Figura 14. Unidades Formadoras de Colônias nos diferentes tipos de solo e concentrações de antibióticos.

Houve um aumento ($p < 0,01$) nas UFC em ambos os solos contendo ampicilina nas duas concentrações no 1º dia de incubação (Figura 14). Ao longo do ensaio, durante o 20º e 35º dia essas contagens foram diminuindo, sem apresentar-se uma diferença significativa ($p < 0,05$) no 35º dia no solo de pastagem em ambas as concentrações em relação ao controle. Entretanto, no solo de floresta houve uma diferença ($p < 0,01$) no 35º em ambas as concentrações dos tratamentos contendo ampicilina em relação ao controle.

Em ambas as concentrações e ambos os solos contendo enrofloxacin, verificou-se um menor número de colônias, comparado com o tratamento controle no

1º dia de incubação. No entanto, apresentou-se uma diferença ($p < 0,05$) na contagem de bactérias na concentração de 100mg/kg em relação ao controle.

A estreptomicina apresentou a contagem mais baixa em relação ao tratamento controle ($p < 0,01$) e não se observou um aumento das UFC até o 35º dia de avaliação no solo de floresta a 30mg/kg ($p < 0,01$) (Figura 14). No solo de Floresta em ambas as concentrações o número de colônias bacterianas no primeiro dia foi maior em comparação ao solo de pastagem bovina com a utilização de ampicilina (Ver Anexo 1).

5.2 Atividade Respiratória Microbiana (ARM)

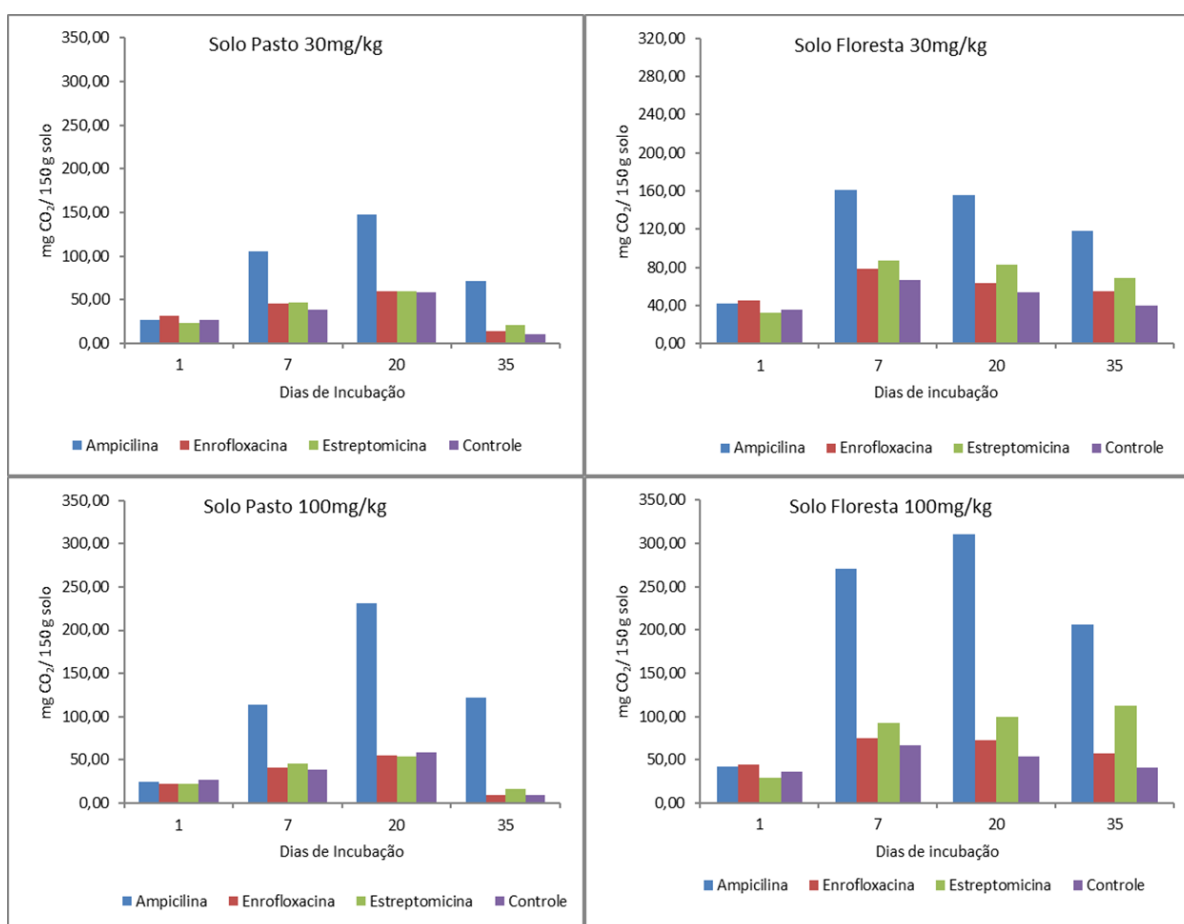


Figura 15. Atividade Respiratória Microbiana nos diferentes tipos de solo e concentrações de antibiótico

Utilizando 100mg/kg de ampicilina, a maior liberação de CO₂ foi observada no solo de Floresta no 7º, 20º e 35º dia ($p < 0,01$) em relação ao controle e os outros

antibióticos. No solo de pastagem bovina essa liberação foi maior no 20° dia de avaliação (Figura 15). Embora no 1° dia, em ambos os solos essa liberação tenha sido baixa em todos os tratamentos, houve uma diferença significativa ($p < 0,01$) entre a estreptomicina em relação á ampicilina, enrofloxacina e tratamento controle no solo de floresta em ambas as concentrações. No solo de pastagem essa diferença foi observada nos três antibióticos em ambas as concentrações em relação ao controle ($p < 0,01$).

A maior liberação de CO_2 nos dois tipos de solo com aplicação de ampicilina foi ao 7° e 20° dia em ambos os solos e concentrações ($p < 0,01$) e até o 35° dia se manteve uma diferença significativa entre os tratamentos com ampicilina em relação aos outros antibióticos e ao tratamento controle ($p < 0,01$). O solo de floresta apresentou uma maior liberação de CO_2 em ambas as concentrações ($p < 0,01$) (Ver Anexo 2)

5.3 Atividade Enzimática da Desidrogenase

No 1° dia, os tratamentos com ampicilina apresentaram a maior atividade da desidrogenase (Figura 16) em todos os tratamentos e em relação ao controle ($p < 0,01$). Durante o 20° dia, esse parâmetro foi menor do que o controle nos três antibióticos no solo de pastagem nas duas concentrações e no solo de floresta no tratamento de 30mg/kg ($p < 0,05$); diferente do que se observou no tratamento com adição de 100mg/kg de ampicilina no solo de floresta, onde a atividade da desidrogenase foi maior em relação á enrofloxacina e estreptomicina ($p < 0,01$) e ao controle ($p < 0,05$).

Os valores da enrofloxacina ($p < 0,05$) e estreptomicina ($p < 0,01$) em todos os tratamentos permaneceram abaixo da média do controle, indicando baixa atividade microbiana em ambas as concentrações nos dois tipos de solo (Ver Anexo 3)

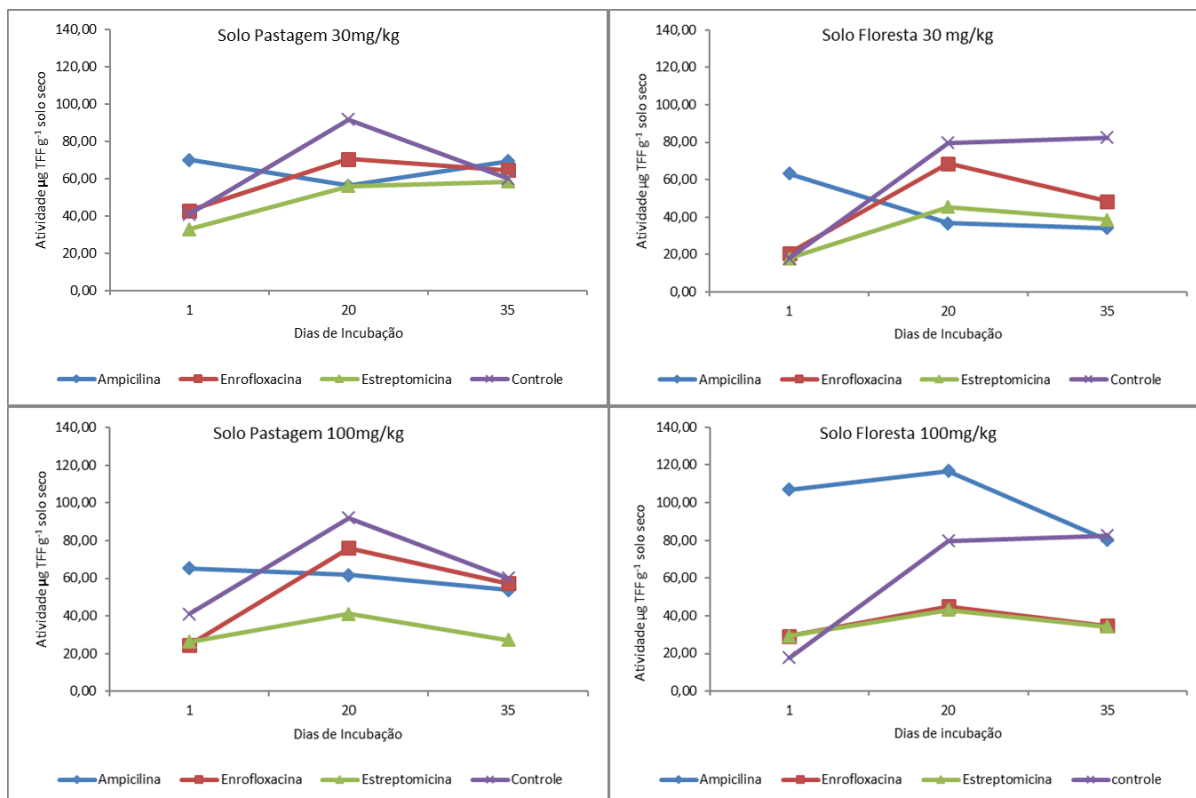


Figura. 16 Atividade da Enzima desidrogenase nos diferentes tipos de solo e concentrações de antibiótico

6. DISCUSSÃO

Embora os dois solos fossem diferentes nas suas características, bem como na sua atividade microbiana, a maioria dos resultados obtidos foram independentes do tipo de solo. Este resultado pode estar relacionado com o comportamento muito semelhante dos três antibióticos e suas diferentes concentrações em ambos os solos.

As duas concentrações de ampicilina utilizadas, não inibiram o crescimento bacteriano e sim aumentaram as populações de bactérias em ambos os solos e concentrações. A maior quantidade de bactérias foi encontrada nos solos que receberam as maiores concentrações de ampicilina. A ARM e a atividade da desidrogenase também foram maiores em ambos os casos, isso provavelmente devido a que alguns grupos bacterianos podem estar utilizando algum composto da ampicilina para aumentar sua população. Em um estudo feito com ciprofloxacina, Kotzerke et al. (2008) encontraram que é provável que microrganismos resistentes possam ter proliferado utilizando a ciprofloxacina ou biomassa morta como um substrato orgânico para o crescimento. Como o solo de floresta possui maior matéria orgânica que o solo de pastagem de bovinos, as contagem das UFC foram maiores nesse tipo de solo em ambas as concentrações.

Também é provável que as comunidades microbianas aumentadas no tratamento com ampicilina, seja devido à presença de genes de resistência a esse antibiótico já que a ampicilina é um exemplo de fármaco que perdeu sua eficácia rapidamente, pois depois do seu descobrimento, a resistência bacteriana foi encontrada 15 anos depois (PALUMBI, 2001). Um estudo feito por Marquardt (2007) sobre resistência de diferentes antibióticos em solos de granja demonstrou que a resistência a ampicilina foi maior do que a resistência à tetraciclina e ao cloranfenicol, independentemente do tipo de solo. Nesse mesmo estudo foi achado que o crescimento bacteriano foi maior em solo orgânico na presença desse antibiótico, comparando-se ao controle e aos outros antibióticos utilizados. As cepas resistentes à ampicilina contêm um gene que faz com que uma das enzimas inative o antibiótico, tornando-o não efetivo (WHITE et al. 2005).

A ampicilina pertence à família dos antibióticos β -lactâmicos assim como a penicilina. Zhang e Dick (2014) demonstraram que as bactérias resistentes podem utilizar a penicilina como única fonte de carbono para seu crescimento, pois não foi

adicionada ao meio de cultura outra fonte de nutrientes, com relação aos controles e a outros antibióticos.

Os resultados do presente estudo mostram que os micro-organismos presentes no solo de pastagem aumentaram em número após a aplicação da ampicilina e como mencionado anteriormente, muitos autores explicam esse resultado pelo fato de se haver organismos da microbiota resistentes à ampicilina. Provavelmente isso seja verdadeiro, pois o solo sob pastagem recebe diariamente uma quantidade de ampicilina proveniente de fezes e urina do gado utilizado para a produção animal. Entretanto, os resultados foram semelhantes para o solo de floresta cuja microbiota, teoricamente, nunca entrou em contato com a ampicilina. É provável uma parcela de toda resistência antimicrobiana ocorra naturalmente e não como consequência do uso indiscriminado de antimicrobianos.

A enrofloxacin e estreptomycin apresentaram contagens de UFC abaixo do tratamento controle em ambas as concentrações, mas a estreptomycin apresentou a contagem mais baixa em todos os tratamentos, indicando uma queda significativa na população bacteriana do solo em relação aos controles. O tratamento com esse antibiótico também apresentou valores de atividade de desidrogenase abaixo do controle e os seus valores também foram os menores entre os três antibióticos na ARM, independentemente das concentrações utilizadas. Bei et al. (2015) num estudo com clortetraciclina encontrou que o valor mínimo de desidrogenase é alcançado nas concentrações mais altas dos tratamentos, o que sugere que a inibição era mais óbvia à maior concentração de clortetraciclina. No nosso caso, a inibição foi maior no solo de floresta na mais alta concentração de estreptomycin.

Ao longo do período de incubação, a contagem de UFC dos tratamentos contendo enrofloxacin foi aumentando gradualmente até chegar próximo ao valor da média do controle no último dia de incubação. No caso da estreptomycin, as contagens microbianas diminuíram no primeiro dia e se mantiveram constantes até o 35° indicando uma alta taxa de morte bacteriana durante esse período de tempo sem tendência a ter um aumento da população de bactérias. Assim o uso indiscriminado desse antibiótico poderia afetar negativamente a presença de matéria orgânica no solo.

Zhiyong et al. (2012) também verificaram uma diminuição da população bacteriana do solo nos tratamentos contendo enrofloxacina. Também tem sido demonstrada a perturbação das comunidades microbianas, em que o antibiótico tilosina pode ter afetado na dinâmica do solo. Westergaard et al. (2001) também demonstraram que a estrutura das comunidades bacterianas foi alterada em resposta a uma perturbação transitória depois que a tilosina tinha desaparecido.

A microbiota do solo no presente estudo demonstrou uma capacidade de recuperação do número populacional bacteriano próximo aos valores do tratamento controle. Esse efeito de recuperação foi maior para os tratamentos que receberam ampicilina e enrofloxacina e menor para o tratamento que recebeu a estreptomicina.

Esses resultados sugerem que o efeito antimicrobiano é muito dependente do antibiótico utilizado assim como do tempo de exposição.

7. CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que os efeitos dos antibióticos não foram influenciados pelo tipo de solo. A estreptomicina e enrofloxacina diminuíram a população microbiana do solo. A ampicilina aumentou o número total de bactérias do solo de pastagem e do solo de floresta. A estreptomicina apresentou os valores mais baixos em relação ao número total de bactérias em todas as concentrações e em ambos tipos de solo. O aumento do número de bactérias ocorreu no solo de floresta que em teoria nunca entraram em contato com essa molécula anteriormente. O efeito antimicrobiano é muito dependente do antibiótico utilizado assim como do tempo de exposição.

8. REFERENCIAS

ADZITEY, F. Antibiotic Classes and Antibiotic Susceptibility of Bacterial Isolates from Selected Poultry; A Mini Review. **World's Veterinary Journal**, v. 5(3), p. 36-41, 2015.

BEI, L.; YANXIA, L.; XUELIAN, Z.; JING, W.; MIN, G. Combined effects of chlortetracycline and dissolved organic matter extracted from pig manure on the functional diversity of soil microbial community. **Soil Biology and Biochemistry** v.74, p.148-155, 2015.

BELKNAP, S.M. Aminoclycoside Antibiotics. In: CRAIG, C.R., STITZEL, R.E. **Modern Pharmacology with Clinical Applications**. 6a ed. Baltimore: Lipincott Williams and Wilkins, 2004. cap. 46, p. 538-543.

BLACKWELL, P.A., KAY, P., BOXALL, A.B.A. The dissipation and transport of veterinary antibiotics in a sandy loam soil. **Chemosphere**, v. 67, p. 292-299, 2007.

BOECKEL, T.P. van; BROWER, C.; GILBERT, M.; GRENFELL, B.T.; LEVIN, S.A.; ROBINSON T.P.; TEILLANT, A.; LAXMINARAYAN, R. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 18, p. 5649–5655, 2015.

BORGES, J.; MARQUES, R. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 601-616, 2010.

BOXALL, A.B.A., KOLPIN, D.W., HALLING-SØRENSEN, B., TOLLS, J. Are veterinary medicines causing environmental risks? **Environmental Science & Technology**, v. 37, p. 286A-294A, 2003.

BRADY, N.C. **Natureza e Propriedades dos Solos**. 7ª ed., Freitas Bastos, Rio de Janeiro.1989.

BRADY, N.C. WEIL,R.R. **Elementos da Natureza e Propriedades dos Solos**. 3ª ed., Bookman, Porto Alegre. 2013.

BRANDT, K.K.; AMÉZQUITA, A.; BACKHAUS, T.; BOXALL, A.; COORS, A.; HEBERER, T.; LAWRENCE, J.R.; LAZORCHAK, J.; SCHÖNFELD, J.; SNAPE, J.R.; ZHU, Y.G.; TOPP, E. Ecotoxicological assessment of antibiotics: A call for improved consideration of microorganisms. **Environment International**, v. 85, p. 189-205, 2015.

CARACCILO, A.B.; TOPP, E.; GRENNI, P. Pharmaceuticals in the environment: Biodegradation and effects on natural microbial communities: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 10, p. 25-36, 2015.

CASIDA, L.E.; KLEIN, D.A.; SANTORO, T. Soil dehydrogenase activity. **Soil Science**, v. 98, p. 371-376, 1964.

COMPASSION IN WORLD FARMING. Antibiotics in farm animal production: Public health and animal welfare. p. 43, 2011.

DAUGHTON, C.G.; TERNES T.A. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change? **Environmental Health Perspectives** v. 107, p. 907-938, 1999.

DÍAZ-CRUZ, M.S., BARCELÓ, D. Recent advances in LCMS residue analysis of veterinary medicines in the terrestrial environment. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**. v. 26, p. 637-646, 2007.

DÍAZ-CRUZ, M.S., DE ALDA, M.J.L., BARCELÓ, D. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, p. 340-351, 2003.

DRLICA, K. Mechanism of fluoroquinolone action. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 504–508, 1999.

DU, L.; LIU, W. Occurrence, fate, and ecotoxicity of antibiotics in agroecosystems: A review. **Agronomy of Sustainable Development**, v. 32, p. 309-327, 2012.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-Producing Animals, Summary Report 2014, **Food and Drug Administration**, p. 58, 2015.

HALLING-SORENSEN, B.; SENGELOV, G.; TJORNELUND, J.; Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 42, p. 263-271, 2002.

JECHALKE, S.; HEUER, H.; SIEMENS, J.; AMELUNG, W.; SMALLA, K. Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 9, p. 536-545, 2014.

JENKINSON, D.S.; POWLSON, D.S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil – I. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 8, p. 167-177, 1976.

JUNWEI, M.; HUI, L.; WANCHUN, S.; QIANG, W.; QIAOGANG, Y.; YUHUA Z.; JIANRONG, F. Soil microbial systems respond differentially to tetracycline, sulfamonomethoxine, and ciprofloxacin entering soil under pot experimental conditions alone and in combination. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 7436-7448, 2014.

KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. **Ecological Indicators**, v. 8, p. 1-13, 2008.

KIM, S.C.; DAVIS, J.G.; TRUMAN, C.C.; ASCOUGH, J.C.; CARLSON, K. Simulated rainfall study for transport of veterinary antibiotics - mass balance analysis. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, p. 836-843, 2010.

KLEINEIDAM, K.; SHARMA, S.; KOTZERKE, A.; HEUER, H.; THIELE-BRUHN, S.; SMALLA, K.; WILKE, B.M.; SCHLOTTER, M. Effect of sulfadiazine on abundance and diversity of denitrifying bacteria by determining nirK and nirS genes in two arable soils. **Microbial Ecology**, v. 60, p. 703-707, 2010.

KOTZERKE, A.; SHARMA, S.; SCHAUSS, K.; HEUER, H.; THIELE-BRUHN, S.; SMALLA, K.; WILKE, B. M.; SCHLOTTER, M. Alterations in soil microbial activity and N-transformation processes due to sulfadiazine loads in pig-manure. **Environmental Pollution**, v. 153, p. 315-322, 2008.

KREBS, C.J. **Ecology: The Experimental Analysis of Distribution and Abundance**. 6a ed. Benjamin Cummings. São Francisco-California. 2009.

KUMAR, R.R.; LEE, J.T.; CHO, J.Y.; Fate, occurrence, and toxicity of veterinary antibiotics in environment. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 55, p. 701-709, 2012.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – a review – Part I. **Chemosphere**, v. 75, p. 417-434, 2009.

KÜMMERER, K. Significance of antibiotics in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 5-7, 2003.

LIU, F.; YING, G.G.; TAO, R.; ZHAO, J.L.; YANG J.F.; ZHAO, L.F.; Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 1636-1642, 2009.

MARQUARDT, K., Antibiotic Resistance to Ampicillin, Tetracycline, Kanamycin, and Chloramphenicol in Bacterial Isolates from Local Farm Soil. Elon, North Carolina, USA, 39p. (An Honors Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Elon University Honors Program).

MINGEOT-LECLERCQ, M.P., GLUPCZYNSKI, Y., TULKENS, P.M. Aminoglycosides: Activity and Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43(4), p. 727-737, 1999.

MITCHELL, M.A. Therapeutic Review: Enrofloxacin. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 15, p. 66-69, 2006.

MONTEIRO, S.C.; BOXALL, A.B.A. Occurrence and fate of human pharmaceuticals in the environment. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 202, p. 53-154, 2010.

MOREIRA, F.M.S., SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2a ed. UFLA, Lavras.2006.

NUSSBAUM, F. von; BRANDS, M.; HINZEN, B.; WEIGAND, S.; HABICH, D. Antibacterial Natural Products in Medicinal Chemistry—Exodus or Revival? **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, p. 5072-5129, 2006.

ODUM,E.P. **Fundamentos de Ecologia**. 6aed., Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa.2001.

ODUM,E.P.,BARRET,G.W. **Fundamentos de Ecologia**. 5a ed., ed. Thomson Learning., São Paulo. 2007.

OK, Y.; KIM, S.C.; KIM, K.R.; LEE, S.; MOON, D.; LIM, K.; SUNG, J.K.; HUR, S.O.; YANG, J. Monitoring of selected veterinary antibiotics in environmental compartments near a composting facility in Gangwon Province, Korea. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 174, p. 693-701, 2011.

OLIVEIRA, D.; SILVA, M. da; TALLARICO, M. Antibióticos: Importância Terapêutica e Perspectivas Para a Descoberta e Desenvolvimento de Novos Agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

OLIVEIRA, J.B., JACOMINE, P.K.T., CAMARGO, M.N. Classes Gerais de Solos do Brasil Guia auxiliar para seu reconhecimento. Funep. Jaboticabal. 1992.

OLLIVIER, J.; KLEINEIDAM, K.; REICHEL, R.; THIELE-BRUHN, S.; KOTZERKE, A.; KINDLER, R.; WILKE, B.M.; SCHLOTTER, M. Effect of sulfadiazine contaminated pig manure on the abundances of genes and transcripts involved in nitrogen transformation in the root–rhizosphere complexes of maize and clover. **Applied Environmental Microbiology**, v. 76, p. 7903-7909, 2010.

PALUMBI, S.R. Humans as the world's greatest revolutionary force. **Science**, v. 293(5536), p. 1786-90. 2001.

PROJAN, S. J.; SHLAES, D. M. Antibacterial drug discovery: is it all downhill from here? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10 n. 4, p. 18-22, 2004.

RAIJ, B. van.; QUAGGIO, J.A.; CANTARELLA, H.; FERREIRA, M.E.; LOPES, A.S.; BATAGLIA, O.C. Análise química do solo para fins de fertilidade. Campinas, Fundação Cargill, 170p, 1987.

REDGRAVE, L.S., SUTTON, S.B., WEBBER, M.A, PIDDOCK, L.J.V. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. **Trends in Microbiology**, v. 22, p. 438-445, 2014.

REICHEL, R., ROSENDAHL, I., PEETERS, E.T.H.M., FOCKS, A., GROENEWEG, J., BIERL, R., SCHLICHTING, A., AMELUNG, W., THIELE-BRUHN, S., Effects of slurry from sulfadiazine- (SDZ) and difloxacin- (DIF) medicated pigs on the structural diversity of microorganisms in bulk and rhizosphere soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 62, p. 82–91, 2013.

REICHEL, R.; PATZELT, D.; BARLEBEN, C.; ROSENDAHL, I.; ELLERBROCK, R.H.; THIELE-BRUHN, S. Soil microbial community responses to sulfadiazine-contaminated manure in different soil microhabitats. **Applied Soil Ecology**, v. 80, p. 15-25, 2014.

SARMAH, A.K.; MEYER M.T.; BOXALL A.B.A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. **Chemosphere**, v. 65, p. 725-759, 2006.

SILVA, F.H.B.B, SILVA, M.S.L., CAVALCANTI, A.C. DESCRIÇÃO DAS PRINCIPAIS CLASSES DE SOLO. **Embrapa**. 2006.

SUMANO H.S., OCAMPO, L. **Farmacología Veterinaria**. 3a ed. México D.F: McGraw-Hill Interamericana, 2006. p. 127-329.

TASHO, R.P.; CHO, J.Y. Veterinary antibiotics in animal waste, its distribution in soil and uptake by plants: A review. **Science of the Total Environment**, v. 563-564, p. 366-376, 2016.

THIELE-BRUHN, S., BECK, I.C., Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass. **Chemosphere**, v. 59, p. 457-465, 2003.

WAINRIGHT, M. Streptomycin: Discovery and Resultant Controversy. **History and Philosophy of the Life Sciences**, v. 13(1), p. 97-124, 1991.

WANG, M., TANG, J.C. Research of antibiotics pollution in soil environments and its ecological toxicity. **Journal of Agro-Environment Science**, v. 29, p. 261-266, 2010.

WANG, Q.; GUO, M.; YATES, S.R. Degradation kinetics of manure-derived sulfadimethoxine in amended soil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 157-163, 2006.

WESTERGAARD, K., MULLER, A.K., CHRISTENSEN, S., BLOEM, J., SORENSEN, S.J., Effects of tylosin as a disturbance on the soil microbial community. **Soil and Biochemistry**, v. 33, p. 2061-2071, 2001.

WHITE, D.; ALEKSHUN, M.; MCDERMOTT, P. Frontiers in antimicrobial resistance. ASM Press: Washington DC. 570 p, 2005.

WILKE, M.S., LOVERING, A.L., STRYNADKA, N.C.J. β -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 525-533, 2005.

WOLLUM, A.G., Cultural methods for soil microorganisms. In: Page, A.L.; Miller, R.H. & Keeney, D.R. (Ed.). Methods of soil analysis. Madison: Soil Science Society of America. p.781-802, 1982.

YANG, Q., ZHANG, J., ZHU, K., ZHANG, H., Influence of oxytetracycline on the structure and activity of microbial community in wheat rhizosphere soil. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, p. 954-959, 2009.

ZACCARDELLI, M., DE NICOLA, F., VILLECCO, D., SCOTTI, R. The development and suppressive activity of soil microbial communities under compost amendment. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 13(3), p. 730-742, 2013.

ZHANG, T., LI, B. Occurrence, transformation, and fate of antibiotics in municipal wastewater treatment plants. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 41, n. 11, p. 951-998, 2011.

ZHANGA, Q.; DICK, W. Growth of soil bacteria, on penicillin and neomycin, not previously exposed to these antibiotics. **Science of the Total Environment**, v. 493, p. 445-453, 2014.

ZHIYONG, Y., AYFER Y., MIN Y., SIGURD S. Leaching behavior of enrofloxacin in three different soils and the influence of a surfactant on its mobility. **Journal of Environmental Sciences**, v. 24(3), p. 435-439, 2012.

ZIELEZNY, Y. Analysis of veterinary pharmaceuticals in soil and their impact on microbial populations. Tese (Doutorado). Mathematics and Natural Sciences College. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universidade de Bonn. 2008.

ANEXO 1

Tabela 3. Valores das médias das unidades formadoras de colônia dos fatores principais; antibiótico, concentração e tempo no solo de pastagem

Antibiótico	UFC g⁻¹ SS	Concentração	UFC g⁻¹ SS	Tempo	UFC g⁻¹ SS
<i>Ampicilina</i>	1,38E+07 ^a	<i>Controle</i>	8,73E+06 ^a	<i>1 Dia</i>	1,03E+07 ^a
<i>Enrofloxacina</i>	7,25E+06 ^b	<i>30mg/kg</i>	8,97E+06 ^a	<i>20 Dia</i>	8,01E+06 ^b
<i>Estreptomicina</i>	4,90E+06 ^c	<i>100mg/kg</i>	8,26E+06 ^a	<i>35 Dia</i>	7,67E+06 ^b
Test F	77,479 ^{**}		0,4730 ^{NS}		7,3199 ^{**}
DMS (5%)			1,76E+06		

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5%.

** Significativo a 1% de probabilidade; NS= não significativo. SS= solo seco. DMS= Diferença Mínima Significativa. UFC= Unidades Formadoras de Colônia.

Tabela 4. Valores das médias das Unidades Formadoras de Colônia no solo de pastagem

ANTIBIÓTICO	UFC g⁻¹ SS		
	Controle	30 mg/kg	100 mg/kg
Ampicilina	8,73E+06 ^a	1,62E+07 ^a	1,65E+07 ^a
Enrofloxacina	8,73E+06 ^a	7,06E+06 ^b	5,97E+06 ^b
Estreptomicina	8,73E+06 ^a	3,66E+06 ^c	2,32E+06 ^c
Test F		50,982 ^{**}	65,710 ^{**}
DMS 5%		1,76E+06	

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5%.

** Significativo a 1% de probabilidade. SS= solo seco. DMS= Diferença Mínima Significativa. UFC= Unidades Formadoras de Colônia.

Tabela 5. Valores das médias das unidades formadoras de colônia dos fatores principais; antibiótico, concentração e tempo no solo de floresta

Antibiótico	UFC g⁻¹ SS	Concentração	UFC g⁻¹ SS	Tempo	UFC g⁻¹ SS
<i>Ampicilina</i>	1,53E+07 ^a	<i>Controle</i>	6,01E+06 ^a	<i>1 Dia</i>	1,07E+07 ^a
<i>Enrofloxacina</i>	5,69E+06 ^b	<i>30mg/kg</i>	9,33E+06 ^b	<i>20 Dia</i>	7,76E+06 ^b
<i>Estreptomicina</i>	3,22E+06 ^c	<i>100mg/kg</i>	8,82E+06 ^b	<i>35 Dia</i>	5,66E+06 ^c
Test F	209,92 ^{**}		16,655 ^{**}		33,800 ^{**}
DMS (5%)			1,48E+06		

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5%.

** Significativo a 1% de probabilidade. SS= solo seco. DMS= Diferença Mínima Significativa. UFC= Unidades Formadoras de Colônia.

Tabela 6. Valores das médias das Unidades formadoras de Colônia no solo de floresta

ANTIBIÓTICO	UFC g ⁻¹ SS		
	Controle	30 mg/kg	100 mg/kg
Ampicilina	6,01E+06 ^a	2,01E+07 ^a	1,97E+07 ^a
Enrofloxacina	6,01E+06 ^a	5,84E+06 ^b	5,21E+06 ^b
Estreptomicina	6,01E+06 ^a	2,10E+06 ^c	1,54E+06 ^c
Test F		155,17 ^{**}	159,73 ^{**}
DMS 5%		2,55E+06	

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5%.

^{**} Significativo a 1% de probabilidade. SS= solo seco. DMS= Diferença Mínima Significativa. UFC= Unidades Formadoras de Colônia.

ANEXO 2

Tabela 7. Valores das médias da atividade respiratória microbiana dos fatores principais; antibiótico, concentração e tempo no solo de pastagem

Antibiótico	mg CO₂	Concentração	mg CO₂	Tempo	mg CO₂
<i>Ampicilina</i>	81,560 ^a	<i>Controle</i>	33,559 ^c	<i>1 Dia</i>	25,862 ^d
<i>Enrofloxacina</i>	34,803 ^b	<i>30mg/kg</i>	54,917 ^b	<i>7 Dias</i>	57,263 ^b
<i>Estreptomicina</i>	35,380 ^b	<i>100mg/kg</i>	63,267 ^a	<i>20 Dias</i>	87,486 ^a
				<i>35 Dias</i>	31,712 ^c
Test F	595,36 ^{**}		194,15 ^{**}		490,80 ^{**}
DMS (5%)	36,827		36,827		46,674

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5%.

** Significativo a 1% de probabilidade. DMS= Diferença Mínima Significativa.

Tabela 8. Valores das médias da atividade respiratória microbiana no solo de pastagem

ANTIBIÓTICO	mg CO₂		
	Controle	30 mg/kg	100 mg/kg
Ampicilina	33,559 ^a	88,013 ^a	123,11 ^a
Enrofloxacina	33,559 ^a	39,062 ^b	31,788 ^b
Estreptomicina	33,559 ^a	37,675 ^b	34,905 ^b
Test F		226,61 ^{**}	741,09 ^{**}
DMS 5%		63,786	

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5%.

** Significativo a 1% de probabilidade. DMS= Diferença Mínima Significativa.

Tabela 9. Valores das médias da atividade respiratória microbiana dos fatores principais; antibiótico, concentração e tempo no solo de floresta

Antibiótico	mg CO₂	Concentração	mg CO₂	Tempo	mg CO₂
<i>Ampicilina</i>	125,13 ^a	<i>Controle</i>	48,723 ^c	<i>1 Dia</i>	38,296 ^c
<i>Enrofloxacina</i>	57,170 ^c	<i>30mg/kg</i>	82,505 ^b	<i>7 Dias</i>	106,77 ^a
<i>Estreptomicina</i>	66,546 ^b	<i>100mg/kg</i>	117,61 ^a	<i>20 Dias</i>	104,82 ^a
				<i>35 Dias</i>	81,904 ^b
Test F	2884,5 ^{**}		2523,6 ^{**}		1616,7 ^{**}
DMS (5%)	22,965		22,965		29,105

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5%.

** Significativo a 1% de probabilidade. DMS= Diferença Mínima Significativa.

Tabela 10. Valores das médias da atividade respiratória microbiana no solo de floresta

ANTIBIÓTICO	mg CO₂		
	Controle	30 mg/kg	100 mg/kg
Ampicilina	48,723 ^a	119,42 ^a	207,24 ^a
Enrofloxacina	48,723 ^a	60,456 ^c	62,331 ^c
Estreptomicina	48,723 ^a	67,644 ^b	83,270 ^b
Test F		733,58 ^{**}	4348,6 ^{**}
DMS 5%		3,9777	

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5%.

** Significativo a 1% de probabilidade. DMS= Diferença Mínima Significativa.

ANEXO 3

Tabela 11. Valores das médias da desidrogenase dos fatores principais; antibiótico, concentração e tempo no solo de pastagem

Antibiótico	µg TFF⁻¹ SS	Concentração	µg TFF⁻¹ SS	Tempo	µg TFF⁻¹ SS
<i>Ampicilina</i>	63,690 ^a	<i>Controle</i>	65,369 ^a	<i>1 Dia</i>	42,404 ^c
<i>Enrofloxacina</i>	59,212 ^a	<i>30mg/kg</i>	58,098 ^a	<i>7 Dias</i>	70,007 ^a
<i>Estreptomicina</i>	48,765 ^b	<i>100mg/kg</i>	48,201 ^b	<i>20 Dias</i>	59,256 ^b
Test F	10,128 ^{**}		12,823 ^{**}		33,427 ^{**}
DMS (5%)			8,0877		

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5%.

** Significativo a 1% de probabilidade. SS= solo seco. DMS= Diferença Mínima Significativa.

TFF= Trifenilformazan

Tabela 12. Valores das médias da desidrogenase no solo de pastagem

ANTIBIÓTICOS	µg TFF⁻¹ SS		
	Controle	30 mg/kg	100 mg/kg
Ampicilina	65,369 ^a	65,401 ^a	60,300 ^a
Enrofloxacina	65,369 ^a	59,525 ^{ab}	52,743 ^a
Estreptomicina	65,369 ^a	49,368 ^b	31,559 ^b
Test F		3,7868 [*]	12,777 ^{**}
DMS 5%		14,008	

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5%.

** Significativo a 1% de probabilidade; * Significativo a 5% de probabilidade. SS= solo seco. DMS= Diferença Mínima Significativa. TFF= Trifenilformazan

Tabela 13. Valores das médias da desidrogenase dos fatores principais; antibiótico, concentração e tempo no solo de floresta

Antibiótico	µg TFF⁻¹ SS	Concentração	µg TFF⁻¹ SS	Tempo	µg TFF⁻¹ SS
<i>Ampicilina</i>	72,120 ^a	<i>Controle</i>	70,389 ^a	<i>1 Dia</i>	45,873
<i>Enrofloxacina</i>	50,857 ^b	<i>30mg/kg</i>	42,290 ^c	<i>20 Dias</i>	64,205
<i>Estreptomicina</i>	44,717 ^c	<i>100mg/kg</i>	55,015 ^b	<i>35 Dias</i>	57,615
Test F	64,435 ^{**}		61,688 ^{**}		26,868 ^{**}
DMS (5%)			60,206		

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5%.

** Significativo a 1% de probabilidade. SS= solo seco. DMS= Diferença Mínima Significativa.

TFF= Trifenilformazan

Tabela 14. Valores das médias da desidrogenase no solo de floresta

ANTIBIÓTICOS			
	Controle	30 mg/kg	100 mg/kg
Ampicilina	70,389 ^a	44,705 ^a	101,26 ^a
Enrofloxacina	70,389 ^a	45,898 ^a	36,284 ^b
Estreptomicina	70,389 ^a	36,267 ^a	27,495 ^b
Test F		2,8632 ^{NS}	168,64 ^{**}
DMS 5%		10,428	

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5%.

** Significativo a 1% de probabilidade; NS= não significativo. SS= solo seco. DMS= Diferença Mínima Significativa. TFF= Trifenilformazan