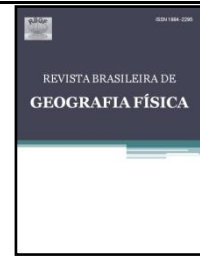




Revista Brasileira de Geografia Física

Homepage: <https://periodicos.ufpe.br/revistas/rbgfe>



Impacto, em curto prazo, dos antibióticos amoxicilina e doxiciclina na qualidade microbiana de um Latossolo Vermelho-amarelo¹

Luiz Gustavo Paulon Rezende², Márcia Matiko Kondo³, Rogério Melloni⁴

²Farmacêutico, Biólogo, Mestre em Ciências em Meio Ambiente e Recursos Hídricos pela Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI), Campus Itajubá. Av. BPS, nº1303, Pinheirinho, Itajubá-MG – Brasil, CEP 37500-903, e-mail: lgpaulon@yahoo.com.br.

³Química, Prof.^a Dr.^a Titular do Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Recursos Hídricos (MEMARH) no Centro de Estudos em Qualidade Ambiental (CEQUAM), Instituto de Física e Química (IFQ) da Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI), Campus Itajubá. Av. BPS, nº1303, Pinheirinho, Itajubá-MG – Brasil, CEP 37500-903, e-mail: marciamkondo@gmail.com; (Autora correspondente).

⁴Engenheiro Agrônomo, Prof. Dr. Titular do Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Recursos Hídricos (MEMARH) no Centro de Estudos em Qualidade Ambiental (CEQUAM), Instituto de Recursos Naturais (IRN) da Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI), Campus Itajubá. Av. BPS, nº1303, Pinheirinho, Itajubá-MG – Brasil, CEP 37500-903, e-mail: rogerio.melloni@gmail.com.

Artigo recebido em 13/02/2019 e aceito em 24/05/2019

RESUMO

Concentrações residuais de antibióticos de uso compartilhado pela terapia médica humana e veterinária são cada vez mais frequentes nos mais variados tipos de matrizes ambientais; no entanto, pouco se sabe sobre o impacto que esses fármacos podem acarretar aos microrganismos do solo. Sendo assim, perturbações relacionadas à exposição da microbiota de um latossolo vermelho-amarelo brasileiro a dois antibacterianos, a amoxicilina (AMOX) e a doxiciclina (DOX), foram investigadas por meio da determinação de atividade (mg CO₂) e biomassa (C_{mic}) microbianas, juntamente com o quociente metabólico (qCO₂), em amostras de solo que receberam as seguintes concentrações desses compostos: 0,03, 0,3, 3,0, 30 e 300 mg L⁻¹. Os resultados mostraram diferentes efeitos sobre a microbiota e de forma específica para cada antibiótico. A AMOX mostrou-se mais impactante para os microrganismos do solo, com redução da biomassa e aumento do qCO₂, enquanto que a DOX reduziu a atividade microbiana, mas sem efeito na biomassa e qCO₂.

Palavras-chave: Antibióticos. Amoxicilina. Doxiciclina. Bioindicadores. Latossolos.

Short-term impact of the antibiotics amoxicillin and doxycycline on the microbial quality of a Red-yellow Latosol

ABSTRACT

The residual concentrations of antibiotics used by human and veterinary medical therapy are increasingly common in a wide range of environmental matrices, nevertheless little is known about the impact of these drugs on to the soil microorganisms. Therefore, disturbances related to the exposure of the microbiota of a Brazilian Red-yellow Latosol to two antibacterials, amoxicillin (AMOX) and doxycycline (DOX), were investigated through the determination of the microbial activity (mg CO₂) and biomass (C_{mic}), among with the metabolic quotient (qCO₂), using soil samples spiked with: 0,03, 0,3, 3,0, 30 and 300 mg L⁻¹ of each drug. The results showed different effects on the microbiota and in a specific way for each antibiotic. The AMOX showed higher impact impacting for the soil microorganisms, with reduction of the biomass and increase of the qCO₂, whereas the DOX reduced the microbial activity, but showed no effect in the biomass and qCO₂.

Keywords: Antibiotics. Amoxicillin. Doxycycline. Bioindicators. Latosols.

Introdução

O agronegócio é uma das atividades de maior expressão na economia brasileira. A agropecuária é um fator que impulsiona esse

negócio e que movimentou o país produzindo renda, gerando empregos e colocando o Brasil em lugar de destaque na produção de alimentos no mundo (MAPA, 2018).

Entretanto, a criação de animais visando a produção de alimentos de origem animal, além de assegurar a competitividade e o abastecimento do setor alimentício nacional e internacional, acaba por impulsionar um consumo cada vez mais crescente de medicamentos de uso veterinário (MVs), com a finalidade de tratar ou prevenir doenças e, também, garantir bem estar animal e produtividade nos criadouros (Nascimento, Batista Filho e Dias, 2016; Dinh et al., 2017; SINDAN, 2018).

Um outro problema gerado pelo elevado consumo de MVs durante esses processos produtivos tem relação com a farmacocinética e farmacodinâmica dessas substâncias, pois nem todo fármaco utilizado com finalidade profilática ou terapêutica é completamente absorvido pelo organismo dos animais, sendo que uma boa parte destes compostos e/ou seus metabólitos acaba sendo eliminada pelas fezes e urina, tendo como destino final o solo ou mesmo os corpos hídricos (Kuppusamy et al., 2018).

Dessa forma, o uso de MVs como recurso farmacológico, quando realizado indiscriminadamente ou quando as boas práticas de produção não forem devidamente seguidas, podem tornar-se ineficientes para o propósito ao qual são destinados, levando à disseminação de doenças e/ou conduzindo a presença indesejada de resíduos nos produtos provenientes dos animais tratados; oferecendo, portanto, risco à saúde humana e a outros tipos de organismos (Rath et al., 2016).

Com o uso intensivo de MVs e fertilizantes naturais – esterco na forma sólida ou líquida – pela agropecuária, uma demanda cada vez maior de resíduos bioativos, sejam eles fármacos ou seus metabólitos, têm sido detectados em alimentos de consumo humano e animal (Souza, Lage e Prado, 2013; Caselani, 2014; Pacheco-Silva, Souza e Caldas, 2014; Araújo et al., 2015), além dos mais diversos tipos de matrizes ambientais; fato que tem se configurado como preocupante por parte da comunidade científica (Bu et al., 2016; Carvalho e Santos, 2016; Montagner, Vidal e Acayaba, 2017; Oliveira Neto, 2017).

Dentre os diferentes tipos de fármacos que foram identificados como microcontaminantes nos ecossistemas do solo e da água, atenção tem sido dada aos antibióticos, uma vez que o seu uso crescente e o conseqüente desenvolvimento de bactérias resistentes apresentam sérios riscos à saúde humana e animal (Grenni, Ancona e Caracciolo, 2017; Gonzales-Martinez et al., 2018; Kuppusamy et al., 2018).

Antibióticos, assim como outros fármacos, são substâncias com alto potencial contaminante (Vasquez et al., 2014); mesmo sendo sugestivo que

suas moléculas apresentem menor potencial de bioacumulação, quando comparadas aos pesticidas (Regitano e Leal, 2015). Por apresentarem comportamento complexo e específico para cada grupo químico a que pertencem, podem interagir de diferentes formas com a matriz a qual estão adsorvidos (Kim et al., 2012; Braschi et al., 2013; De Franco et al., 2017). Não possuem valores de exposição ambiental normatizados por entidades reguladoras e não são devidamente imobilizados ou degradados por métodos de tratamento de resíduos convencionais. São denominados contaminantes emergentes e pouco se sabe sobre os processos de retenção, transporte, transformação e potencial ecotoxicológico dessas substâncias (Rivera-Utrilla et al., 2013; Shore et al., 2014; Gavrilescu et al., 2015; Souza e Falqueto, 2015; Puckowski et al., 2016).

De acordo com Grenni, Ancona e Caracciolo (2017), uma vez que esses compostos bioativos são inseridos ao ambiente, eles podem afetar comunidades microbianas naturais, sendo que essas desempenham um papel fundamental no desenvolvimento ecológico, na manutenção da qualidade do solo e da água e nos processos biogeoquímicos de ciclagem e degradação de contaminantes orgânicos, graças ao seu amplo reservatório de diversidade genética e capacidade adaptativa.

A presença desses fármacos em determinado tipo de matriz pode desencadear desarranjos em toda estrutura da comunidade microbiana ali presente, atuando de diferentes maneiras sobre a microbiota: como por meio de efeitos diretos (de curto prazo) ou através de efeitos indiretos (de longo prazo), indicando alterações do status normal, não detectadas em organismos ílesos ou não afetados por essas substâncias (Mah, 2012; Peixoto et al., 2017; Gonzales-Martinez et al., 2018).

Levando em conta que os microrganismos constituem um excelente indicador das condições biológicas de determinado tipo de matriz ambiental, principalmente solos, o emprego da atividade (mg CO_2) e o carbono da biomassa (C_{mic}) microbianas – com ou sem cálculo de quociente metabólico ($q\text{CO}_2$) – como bioindicadores para efeitos diretos e de curto prazo da qualidade do solo, há algum tempo, têm sido usados em trabalhos para avaliar o impacto promovido por compostos xenobióticos à microbiota (Bastida et al. 2008).

Contaminantes como herbicidas (Reis et al., 2008; Gomez et al., 2009; Tironi et al., 2009; Zhang et al., 2010; Abbas et al., 2014), corantes e compostos fenólicos (Perovano Filho, Silva e López, 2011), metais pesados (Liao et al., 2010;

Quadro et al., 2011; Zhang et al., 2013; Muhlbachova et al., 2015), pesticidas (Das, Pal e Chowdhury, 2007; Chowdhury et al., 2008; Imfeld; Vuilleumier, 2012; Portilho et al., 2015; Lv et al., 2017), petróleo e seus derivados (Peña et al., 2007; Guo et al., 2012) e fármacos, com ênfase aos antibióticos (Gao et al., 2013; Cui et al., 2014; Reichel et al., 2014; Ma et al., 2016; Waiser et al., 2016; Molaei et al., 2017) são exemplos de substâncias consideradas estranhas à microbiota do solo que foram estudadas em trabalhos realizados nos últimos quinze anos.

Algumas pesquisas desenvolvidas mais recentemente, empregando esses bioindicadores, também têm comprovado alterações significativas tanto na biomassa e atividade microbiana quanto no qCO_2 dos solos, por efeito de práticas de manejo associadas à intensificação da agropecuária (Liu et al., 2016; Belmonte et al., 2018; Qin et al., 2018), adição de adubos (Xu et al., 2016; Wang et al., 2018a; Wang et al., 2018b) e utilização de agrotóxicos (Mukherjee et al., 2016; Lv et al., 2017; Sam, Asuming-Brempong e Nartey, 2017).

Entretanto, apesar de terem sido realizados diferentes trabalhos com o objetivo de se compreender o impacto que compostos xenobióticos exercem, em curto e longo prazos, sobre a microbiota do solo, em regiões de clima tropical e em solos muito intemperizados essas pesquisas, em sua grande maioria, ainda são escassas.

Diante da necessidade de se compreender o comportamento ambiental de substâncias bioativas, como os antibióticos, e da carência na literatura de estudos com ênfase no efeito que esses compostos exercem sobre os microrganismos do solo, o presente trabalho avaliou o comportamento biológico de dois antibióticos de uso compartilhado pela terapia médica humana e animal, a amoxicilina (AMOX) e a doxicilina (DOX), em um latossolo vermelho-amarelo originário do sul do Estado de Minas Gerais.

Material e métodos

Os compostos químicos

Os padrões analíticos da amoxicilina trihidratada (AMOX), (teor 97,1% da base anidra – Facron) e do hclato de doxiciclina (DOX), (teor de pureza 98,9% da substância anidra – Galena Química Farmacêutica Ltda.) utilizados nos experimentos correspondiam a matérias-primas empregadas na manipulação de medicamentos em estabelecimentos que produzem e dispensam esse tipo de produto. Por se tratarem de antimicrobianos antibacterianos, esses fármacos têm dispensação

controlada pela ANVISA (RDC N° 20/2011) e, mesmo esses compostos tendo sido destinados à pesquisa, para suas referidas aquisições, coube à apresentação de prescrição concedida por profissional competente para suas dispensações (ANVISA, 2018).

Todos os outros reagentes que foram usados nos ensaios eram de padrão analítico.

O solo

As amostras de solo utilizadas eram provenientes do horizonte A e pertenciam a um Latossolo Vermelho-amarelo distrófico com características físicas e morfológicas típicas. Trata-se de um solo de cor úmida 7.5YR 2.5/2, teor de umidade de campo 25,0% e porcentagens de areia, silte e argila equivalentes a 34,6%, 11,4% e 54,0%, respectivamente, sendo classificado como de textura argilosa, de acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (SiBCS) (EMBRAPA, 2006; Rezende, 2019). Sua fração de argila é composta basicamente por caulinita e goethita e é um solo com pH de condição fortemente ácida (pH 3,9), apresentando baixos valores de macronutrientes, soma de bases trocáveis, CTC e índice de saturação de bases; possui teor de matéria orgânica médio (2,14%) e altos valores de acidez trocável, acidez potencial e índice de saturação de alumínio, indicando-o como um solo de baixa fertilidade (Rezende, 2019).

Esse material foi coletado nas seguintes coordenadas: latitude 22°41'38.0" S e longitude 45°43'67.9" W, altitude 897 metros sendo proveniente da sub-bacia hidrográfica do Ribeirão José Pereira, na cidade de Itajubá-MG. As amostras de solo foram coletadas a uma profundidade entre 0-10,0 cm, seguindo por peneiramento em malha de 2,0 mm e submetidas à refrigeração ($\pm 4^\circ\text{C}$) para a manutenção da umidade de campo.

A metodologia

Este ensaio consistiu de duas etapas, conforme metodologia proposta por Ferreira, Camargo e Vidor (1999): uma onde as amostras de solo não foram submetidas à irradiação de micro-ondas e outra, quando estas foram irradiadas. Para as amostras não irradiadas, pesaram-se diretamente 40,0 g deste material usando uma balança semi analítica Marte/Shimadzu modelo AS200C (Brasil/Japão) em frascos de vidro com capacidade para 1,0 L, sendo três repetições para cada concentração, onde estas soluções correspondiam a 0,03, 0,3, 3,0, 30 e 300 mg L^{-1} dos fármacos. Um conjunto de três amostras de solo, além das que eram enriquecidas com os antibióticos, não foram

contaminadas com os antimicrobianos, pois se tratavam da concentração $0,0 \text{ mg L}^{-1}$. Um controle também foi preparado em triplicata e o que o diferia das outras amostras é que os seus respectivos frascos de vidro não apresentavam as amostras de solo em seu interior.

Para cada concentração empregada, foram adicionados diretamente na amostra de solo presente no interior dos frascos $1,0 \text{ mL}$ da solução que continha os antibióticos, salvo para a que correspondia a $0,0 \text{ mg L}^{-1}$, na qual se adicionou $1,0 \text{ mL}$ de água deionizada, visando assim, manter as mesmas condições de umidade para todas as amostras não irradiadas. Em seguida, um béquer plástico (polipropileno) com capacidade de $50,0 \text{ mL}$ foi introduzido nos frascos de vidro e, no interior destes béqueres, foram adicionados $10,0 \text{ mL}$ de solução de $\text{NaOH } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$, visando a captação do CO_2 liberado pela biomassa presente nas amostras de solo. Os frascos foram fechados e lacrados usando fita adesiva transparente.

Para as amostras irradiadas, pesou-se, inicialmente, na mesma balança, $40,0 \text{ g}$ deste material em uma placa de Petri de massa conhecida (P_1) para, em seguida, submetê-la à radiação eletromagnética de 2450 MHz no interior de um micro-ondas LG intellowave modelo MS-115 ML (Brasil) por um período de 2 minutos. Após esse procedimento, aguardava-se esse material chegar à temperatura ambiente para ser novamente pesado (P_2), visando assim, se obter o valor, em massa de água, que as amostras de solo perdiam com o processo de irradiação por micro-ondas (P_3). A partir desses resultados, foi possível calcular por meio da Equação 1, de forma isolada, quanto em massa de água deveria novamente ser reintroduzido em cada amostra de solo, padronizando assim a umidade relativa de todas as amostras (irradiadas ou não) ao conduzir o ensaio.

$$P_1 + P_2 = P_3 \quad (1)$$

Onde:

P_1 – é o peso da placa de Petri (P_0) somado ao peso da amostra de solo (P_A)

P_2 – é o peso da placa de Petri com a amostra de solo após a fumigação

P_3 – é o peso de H_2O estimado, em gramas, que a amostra de solo perdeu

Após fazer o ajuste da umidade nos frascos de vidro, foi necessário adicionar à cada amostra irradiada $2,0 \text{ g}$ de amostra de solo original, agora com a finalidade de inocular microrganismos nesse material. A partir daí, foram seguidos os mesmos

procedimentos aplicados anteriormente nas amostras não irradiadas quanto ao número de repetições, emprego de soluções de mesma concentração cujos fármacos estavam dissolvidos, utilização de três amostras não enriquecidas, à colocação dos béqueres no interior dos frascos de vidro, adição de $\text{NaOH } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$ aos béqueres, à vedação dos recipientes e ao uso de três controles.

Todos os frascos de vidro estando devidamente vedados (amostras de solo não irradiada, irradiada e controles), os mesmos foram levados a uma câmara incubadora Fanen modelo 347 CDG (Brasil), onde permaneceram por um período de 10 dias a 28°C .

Após esse período para incubação, retiraram-se os recipientes e, em seguida, os seus respectivos béqueres, anteriormente preenchidos com $\text{NaOH } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$; esses receberam $5,0 \text{ mL}$ de solução de $\text{BaCl}_2 1,0 \text{ mol L}^{-1}$, com o objetivo de estabilizar o titulado e, ao final, adicionou-se uma gota de solução alcóolica de fenolftaleína 1%, como indicador. A titulação foi realizada sob agitação, com o uso de um agitador magnético sem aquecimento Fisatom modelo 572 (Brasil) e utilizando uma bureta graduada de $10,0 \text{ mL}$ preenchida com uma solução de $\text{HCl } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$ padronizada.

A liberação de CO_2 retida na solução de $\text{NaOH } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$ foi calculada pela Equação 2 (Stotzky, 1965), visando assim, chegar à atividade microbiana.

$$mg \text{ CO}_2 = (B - V) \times M \times E \quad (2)$$

Onde:

B = o volume de HCl necessário para titular o excedente de NaOH da prova em branco;

V = o volume de HCl necessário para titular o excedente da amostra;

M = a molaridade do $\text{HCl } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$;

E = o peso equivalente do carbono.

Os valores do carbono presente na biomassa microbiana foram obtidos por meio da Equação 3.

$$C_{mic} = \frac{C_I - C_{NI}}{K_C} = \mu\text{g g}^{-1} \text{ de } C \text{ no solo} \quad (3)$$

Onde:

C_{mic} = carbono presente na biomassa microbiana do solo;

C_I = carbono presente na amostra irradiada;

C_{NI} = carbono presente na amostra não irradiada;

K_c = fator de conversão de 0,45 (De-Polli e Guerra, 1996).

O quociente metabólico (qCO_2) foi obtido por meio da Equação 4.

$$qCO_2 = \frac{mg\ CO_2}{C_{mic}} \quad (4)$$

Onde:

$mg\ CO_2$ = atividade microbiana;

C_{mic} = carbono da biomassa microbiana (Ferreira, Camargo e Vidor, 1999).

O tratamento estatístico

O delineamento experimental se deu, inicialmente, com os dados obtidos sendo submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk ($p < 0,05$) (Shapiro e Wilk, 1965). Após essa avaliação, compararam-se as dosagens, para depois

seguir com a análise de regressão linear utilizando o software Past3® (Hammer, Harper e Ryan, 2001).

Resultados e discussão

Estudos visando avaliar o impacto, a curto prazo, que antibióticos acarretam à microbiota do solo, na verdade, são escassos. A consulta de trabalhos desenvolvidos, anteriormente, que empregaram metodologias e/ou utilizaram fármacos similares – sejam estes pertencentes ou não à mesma classe ou grupo químico – e que apresentam no solo comportamento físico-químico e biológico semelhante aos examinados neste trabalho, foram a base para discussão dos resultados obtidos no presente estudo.

A atividade microbiana foi o primeiro indicador de qualidade do solo investigado e as Figuras 1 e 2 apresentam os gráficos do seu comportamento em função das diferentes doses de antibióticos, AMOX e DOX, respectivamente, inseridas nas amostras de solo.

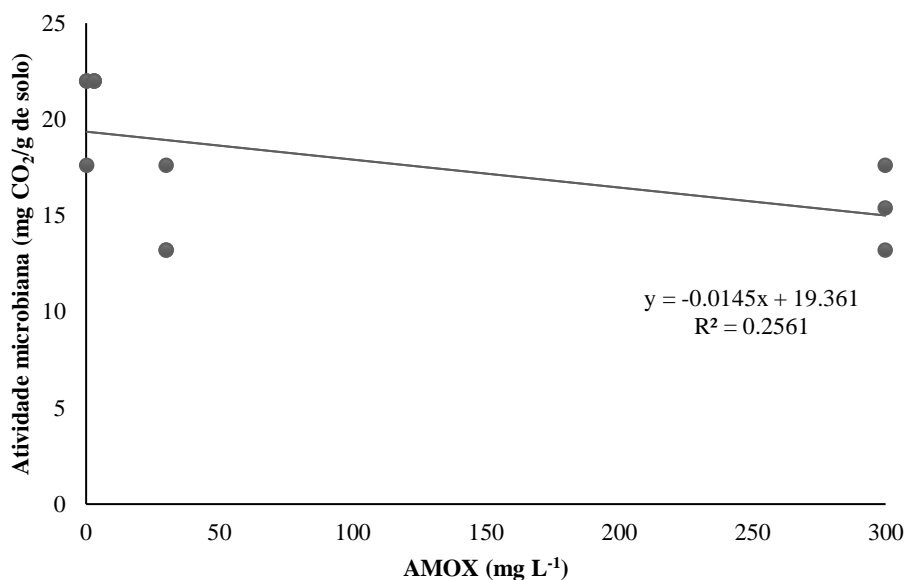


Figura 1. Atividade microbiana em mg CO₂/g de solo em relação a diferentes concentrações do antibiótico AMOX, no período de incubação de 10 dias a $\pm 28^\circ C$.

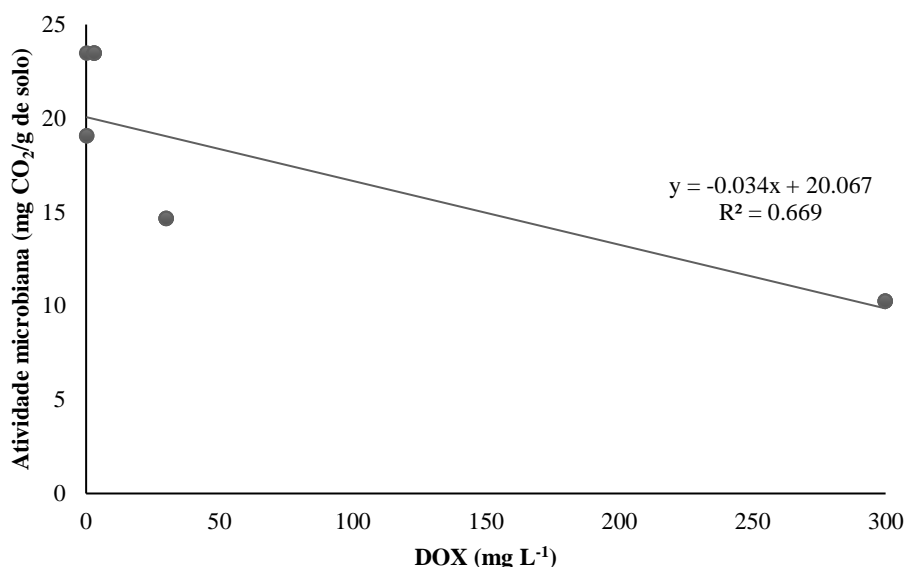


Figura 2. Atividade microbiana em mg CO₂/g de solo em relação a diferentes concentrações do antibiótico DOX, no período de incubação de 10 dias a ± 28°C.

Inicialmente, foi possível observar na Figura 1 que, em uma primeira análise, a atividade apresentou queda, à medida em que as doses de AMOX aumentaram, podendo evidenciar uma condição de perturbação aos microrganismos presentes no solo. Entretanto, isso deve ser visto com cautela, pois o coeficiente de correlação (R²) revelou-se baixo, com a variável dependente (mg CO₂) sendo pouco explicativa para as diferentes doses de antibiótico (variável independente), as quais a microbiota do solo foi exposta. Isso pode indicar pouca influência das concentrações crescentes de AMOX sobre a atividade microbiana.

Já com a DOX, (Figura 2), o R² foi mais explicativo, com 66,9% da variável dependente

sendo influenciada pelas concentrações deste fármaco na regressão linear. Logo, à medida em que as doses do antibiótico testado aumentaram, a atividade foi decaindo, de forma progressiva, sendo um indício de condição de maior estresse microbiano. Sendo assim, evidenciou-se que o efeito promovido pela ação da DOX sobre a microbiota do solo foi mais significativo que o gerado pela AMOX, inclusive com melhor ajuste de equação na análise de regressão.

No que se refere ao peso em carbono da biomassa (C_{mic}), apresentam as Figuras 3 e 4, os resultados da biomassa em função das diferentes doses dos dois antibióticos em que se submeteram as amostras de solo, respectivamente.

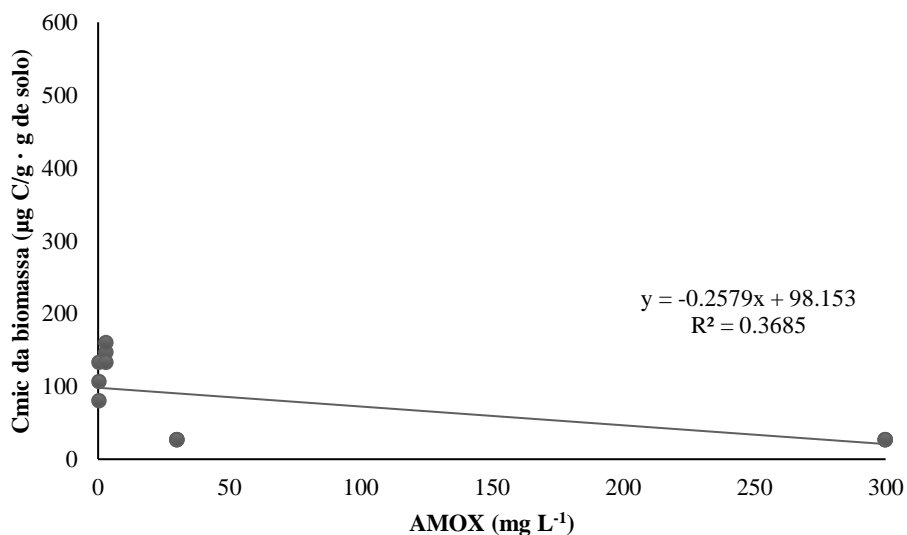


Figura 3. Carbono estimado da biomassa microbiana, em µg C/g · g de solo em relação a diferentes concentrações do antibiótico AMOX, no período de incubação de 10 dias a ± 28°C.

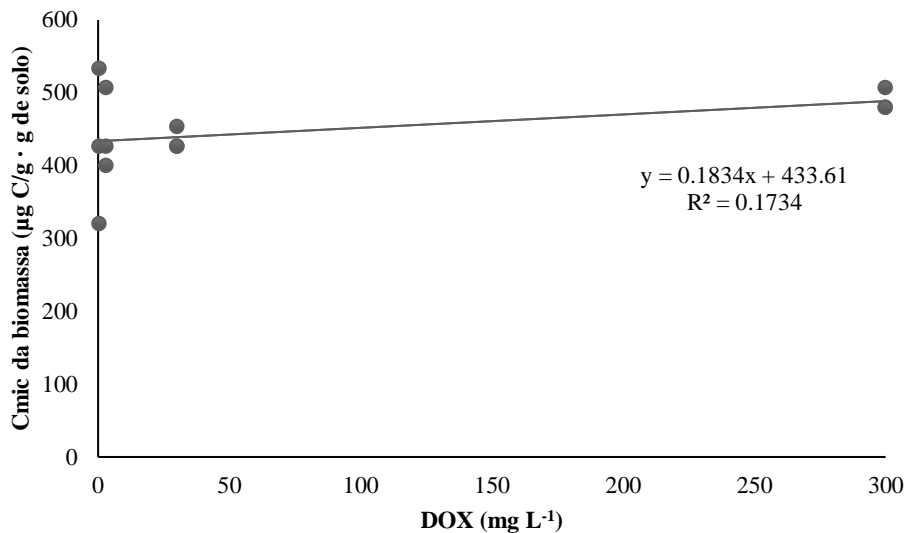


Figura 4. Carbono estimado da biomassa microbiana, em $\mu\text{g C/g} \cdot \text{g de solo}$ em relação a diferentes concentrações do antibiótico DOX, no período de incubação de 10 dias a $\pm 28^\circ\text{C}$.

Por meio das Figuras 3 e 4, nota-se que ocorreram diferenças nos valores de biomassa microbiana nas amostras contendo os diferentes antibióticos. Enquanto que nas amostras de solo contaminadas com AMOX se verificou uma diminuição acentuada na formação de biomassa, nas amostras de solo enriquecidas com DOX as mesmas tiveram um aumento discreto, mesmo quando estes organismos estiveram submetidos a condições de altas doses deste antibiótico. Da mesma forma que foi observado ao analisar o efeito da AMOX sobre a atividade microbiana, o R^2 obtido para a análise com a DOX foi muito baixo, assinalando falta de efeito do referido fármaco sobre a biomassa microbiana.

Apesar de não ter sido verificada, de forma clara, uma diminuição da atividade microbiana quando a microbiota deste solo estava suscetível aos efeitos da AMOX, a influência desse antibiótico sobre a biomassa foi confirmada. Porém, é importante destacar que para a DOX, isso não foi evidenciado, podendo implicar em nenhum impacto desse antibiótico sobre a microbiota do solo, determinado por um possível aumento da biomassa nas amostras de solo contendo este composto. Concluindo, a exposição dos microrganismos do solo à AMOX causou redução da biomassa e pouco ou nenhum efeito sobre a atividade microbiana, enquanto que a DOX reduziu a atividade e praticamente não promoveu efeito sobre sua biomassa.

Kotzerke et al. (2011) investigaram os efeitos do esterco de porco contaminado com AMOX na comunidade microbiana de dois

diferentes solos (um *Orthic Luvisol* e um *Gleyic Cambisol*), provenientes da Alemanha, ao longo de um período de incubação de 18 dias. Por meio de análises coulométricas e técnicas de extração e quantificação, como cromatografia líquida de alta eficiência com detector de massa (LC-MS), os autores concluíram que a respiração basal no solo não foi influenciada pela adição do antibiótico com esterco. Em contrapartida, a cinética da respiração induzida pelo substrato e a transformação do nitrogênio foram claramente alterados pelos tratamentos empregados logo após a adição de esterco contaminado com a AMOX, indicando que as perturbações causadas aos microrganismos do solo têm relação com a presença de substrato e com as concentrações do fármaco na matriz.

Os β -lactâmicos são fármacos que apresentam baixa estabilidade no ambiente (Christian et al., 2003). A AMOX corresponde a um antibacteriano β -lactâmico e deve seguir esse comportamento nos mais variados tipos de matrizes. A sua baixa permanência e alta degradação no solo devem amenizar o impacto promovido aos microrganismos, principalmente em períodos que ultrapassam sua meia vida nos solos (Regitano e Leal, 2015). De acordo com Binh et al. (2007), a adição de esterco de porco contaminado com AMOX tem efeitos transitórios na comunidade microbiana do solo. Apesar deste antibiótico impactar negativamente a microbiota no início da exposição, ocorre efeito contrário após períodos mais prolongados – com ou sem contato com esse fármaco –, pois promove aumento da comunidade microbiana, resistência a múltiplos

antibióticos e transferência dessas informações genéticas ao longo de toda comunidade bacteriana do solo.

Ao estudarem o impacto ocasionado pela oxitetraciclina (OTC) e o sulfametoxazol (SMX) aos microrganismos de um solo franco-arenoso iraniano, Molaei et al. (2017) averiguaram que esses antimicrobianos produziram diferentes efeitos na atividade/respiração cumulativa e biomassa microbiana. O antibiótico SMX afetou significativamente a biomassa e atividade microbiana cumulativa, ocasionando diminuição nos valores obtidos para esses indicadores, à medida em que se aumentou a concentração do fármaco e o tempo de incubação, em um experimento de 21 dias, pelos métodos extração-fumigação e titulação com NaOH, respectivamente. O antibiótico OTC, por outro lado, somente provocou diminuição da atividade cumulativa e não acarretou influência clara na biomassa durante o intervalo de tempo avaliado.

Avaliando os efeitos de uma sulfonamida (sulfapiridina) e uma tetraciclina (oxitetraciclina) sobre a microbiota presente em dois tipos de solos alemães, um *Eutric Cambisol* e um *Albic Luvisol*, Thiele-Bruhn e Beck (2005) relataram que nenhum desses antibióticos desencadearam alterações na atividade microbiana, em dois diferentes ensaios para este indicador: respiração basal e atividade da enzima desidrogenase. Porém, ao pesquisarem os efeitos na biomassa, descreveram que a sulfapiridina promoveu decaimento do valor nas amostras após 14 dias de incubação pelo método de extração-fumigação, enquanto que a oxitetraciclina não exerceu efeito significativo sobre esse indicador. Concluíram que ambos os fármacos exerceram uma pressão seletiva na comunidade microbiana do solo, acarretando dominância fúngica, quantificada por aumento de ergosterol nas amostras com os dois tipos de solo, enquanto que o número de bactérias diminuiu após esse período. A OTC, sendo uma tetraciclina, apresentou o mesmo comportamento demonstrado pela DOX neste tipo de ensaio, confirmando de certa forma, uma tendência evidenciada por antibióticos pertencentes à essa mesma classe ou grupo químico.

Quin et al. (2018) investigaram, empregando o método de extração-fumigação, o efeito de diferentes fertilizantes contaminados com OTC sobre a biomassa de um *ustalf* procedente da província de Shanxi, China, e esse estudo revelou que esse antibiótico afetou negativamente a biomassa, concluindo que perturbações causadas por esse fármaco podem ser geradas ou amenizadas pela escolha de diferentes tipos de fertilizantes associados ou não a inoculantes, fornecendo uma

boa base para o desenvolvimento de metodologias que visam remediar solos contaminados com essa tetraciclina.

Ma et al. (2016) também verificaram as consequências da exposição à microbiota de um solo da província de Liaoning, situada no nordeste da China, à OTC em um experimento com duração de 120 dias. Ao avaliarem a biomassa microbiana pelo método de extração-fumigação constataram que o alto teor de OTC no solo influenciou muito a biomassa, pois sob tais condições, a microbiota do solo consome mais energia para manter seu crescimento e metabolismo, implicando em redução numérica dos microrganismos. Entretanto, passados 28 dias de incubação e perdurando esse comportamento, após 42 dias ocorreu ligeira recuperação nos valores de biomassa, evidenciando restabelecimento da comunidade microbiana do solo. Observaram que a OTC pode ter inibido as bactérias típicas, mas não as actinobactérias ou fungos, que podem ter aumentado e contribuído com o número e função da diversidade microbiana do solo. Os autores concluíram que os efeitos da OTC nos microrganismos do solo estão associados a numerosos fatores como propriedades básicas do solo, tipos e atividades dessa comunidade, conteúdo residual de OTC e também o tempo de exposição a este fármaco.

Como mostrado por Molaei et al. (2017) e Thiele-Bruhn e Beck (2005), a OTC apresentou o mesmo comportamento demonstrado pela DOX na atividade e biomassa microbianas no presente estudo; seguindo, inclusive o mesmo padrão metabólico quando esses autores avaliaram a atividade/respiração cumulativa e respiração basal, respectivamente. Porém isso deve ser avaliado com cuidado, pois Quin et al. (2018) e Ma et al. (2016), apesar de avaliarem o impacto sobre a microbiota por outras metodologias e sob diferentes condições ambientais, obtiveram resultados diferentes, que relacionam diminuição da biomassa à exposição dos microrganismos do solo aos antibióticos. Dessa forma, torna-se importante a utilização de técnicas moleculares para efeito de comparação de resultados e validação de metodologias empregadas.

Cui et al. (2014) em um trabalho que se pesquisou a influência do ciprofloxacino (CIP), um antibiótico da classe das quinolonas, sobre a estrutura e função da comunidade microbiana de um *Ustic Cambosol* proveniente da província de Hebei, localizada no centro-norte da China, utilizaram cromatografia a gás (GC) para mensurar a atividade do solo por quantificação de CO₂ liberado e análise de ácidos graxos derivados de fosfolipídios (PLFAs) para se obter biomassa microbiana, bacteriana e fúngica, e concluíram que

o CIP diminuiu significativamente a biomassa microbiana ($p < 0,05$), mas não afetou a atividade/respiração do solo, mesmo em altas doses, em um ensaio com duração de 40 dias. Os mesmos autores confirmaram que o CIP diminuiu a proporção de bactérias para fungos e aumentou a proporção de bactérias Gram-positivas para bactérias Gram-negativas.

O CIP, assim como os antibióticos da classe das tetraciclina, como a DOX utilizada no presente estudo, é um fármaco com alta sorção no solo, implicando em baixa disponibilidade, maior persistência e menor taxa de decaimento em relação aos β -lactâmicos, como a AMOX

(Regitano e Leal, 2015). Correlacionando os resultados obtidos por Cui et al. (2014), empregando uma técnica de análise molecular, com os dois antibióticos estudados neste trabalho, fica a evidência que a DOX tem um impacto menor em relação à AMOX, devido ao baixo efeito que esse antibiótico desencadeou nos microrganismos do latossolo avaliado.

Com relação ao qCO_2 , que corresponde a razão entre atividade e biomassa microbianas, as Figuras 5 e 6 expressam a relação qCO_2 em função das diferentes doses dos antimicrobianos AMOX e DOX, respectivamente adicionadas às amostras de solo.

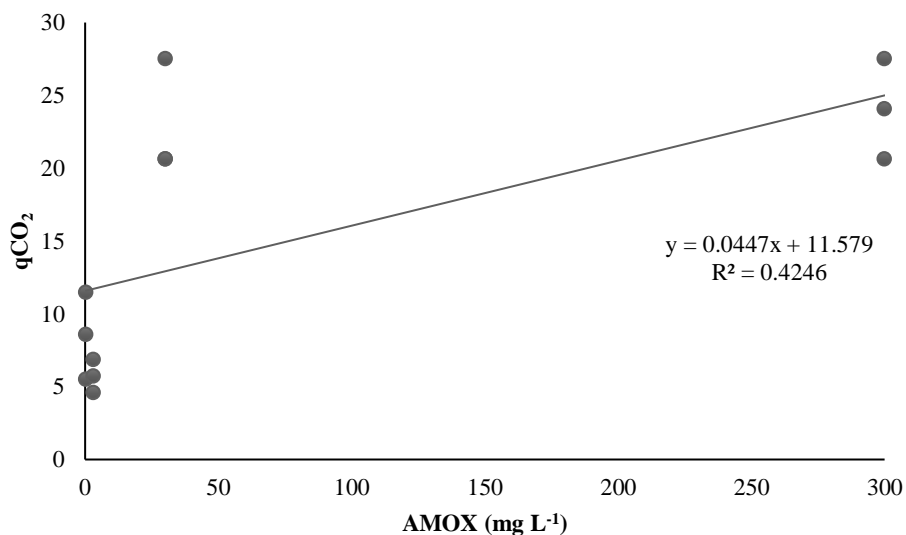


Figura 5. Quociente metabólico em relação a diferentes concentrações do antibiótico AMOX, no período de incubação de 10 dias a $\pm 28^\circ C$.

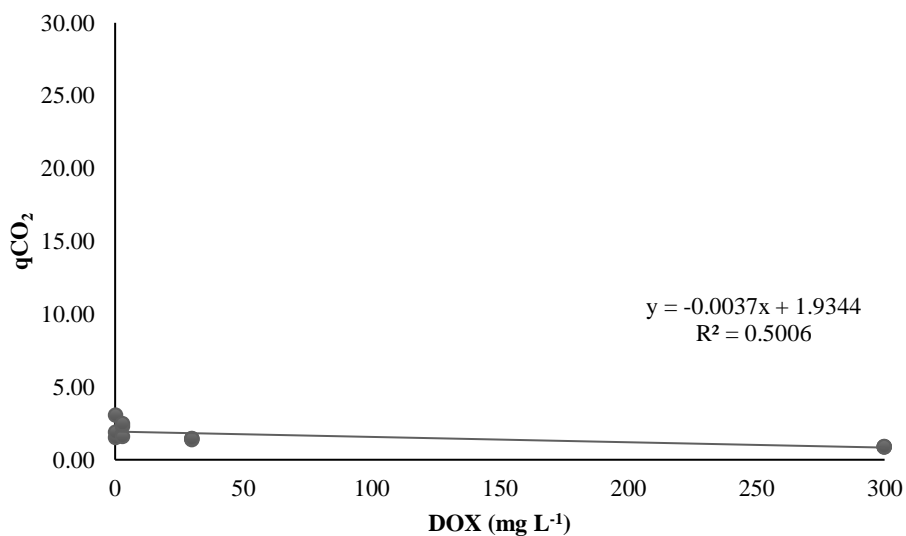


Figura 6. Quociente metabólico em relação a diferentes concentrações do antibiótico DOX, no período de incubação de 10 dias a $\pm 28^\circ C$.

Analisando as Figuras 5 e 6, foi verificado que ocorreu um comportamento oposto entre os

antibióticos. Quando as amostras de solo receberam a AMOX (Figura 5), o qCO_2 aumentou,

significativamente, ao longo das concentrações crescentes dos fármacos, evidenciando assim, perturbação no metabolismo microbiano. Nas amostras que continham a DOX como contaminante (Figura 6), não se verificou a mesma tendência observada na exposição à AMOX, ao contrário, o qCO_2 foi diminuindo, mesmo com o aumento das concentrações de DOX.

Em um primeiro momento, teoricamente, devido à diminuição progressiva do qCO_2 , é possível afirmar que não ocorre uma reação de estresse microbiano em relação à DOX, pois mesmo sob a influência de altas doses do antibiótico, o qCO_2 continuou a cair, evidenciando uma condição normal de metabolismo microbiano. Entretanto, mesmo tendo como parâmetro o decréscimo do valor do qCO_2 e uma não influência sobre o aumento da biomassa, sob condições biológicas reais, não é possível afirmar que os microrganismos estão isentos de sofrerem alterações metabólicas quando sujeitos ao contato com a DOX, pois a atividade teve queda, e isso é uma evidência de perturbação no metabolismo respiratório microbiano.

Muitos compostos, principalmente os xenobióticos, podem exercer influência significativa no metabolismo microbiano, e isso pode não ser percebido ou quantificado pelos indicadores utilizados nos experimentos. De um modo geral, os microrganismos precisam de um período para se adaptarem à presença dessas substâncias em seus habitats e organismos, mas dependendo da forma, intensidade e tempo da exposição a determinados agentes, nem sempre isso ocorre em um intervalo hábil para surgirem adaptações. Entretanto, essas adequações a novas condições ambientais acontecem e isso pode ter implicações negativas sobre as comunidades microbianas do solo e ser impactante até para o ser humano (Binh et al., 2007; Willing, Russell e Finlay, 2011; Ma et al., 2014; Cetecioglu et al., 2015; Lin et al., 2016).

Reichel et al. (2013) investigando os efeitos ocasionados por lama de suínos medicadas com sulfadiazina (SDZ) e difloxacina (DIF) na diversidade estrutural microbiana de um solo rizosférico (*luvisol*) da Alemanha, observaram um aumento significativo no qCO_2 resultante de uma concentração de 1,0 mg de SDZ por quilo de solo, em um experimento com duração de 63 dias; e concluíram que isto reflete uma resposta de alta perturbação à comunidade microbiana do solo a esse antibiótico. Esses autores também verificaram que a forte sorção de DIF para a matriz não eliminou o efeito da lama dos porcos medicados com DIF na composição da comunidade microbiana.

Ao examinar os efeitos da matéria orgânica dissolvida (MOD), extraída do esterco de porco, e de sua combinação com o antibacteriano clortetraciclina, na diversidade funcional da comunidade microbiana do solo na China, Liu et al. (2014) verificaram que a atividade enzimática microbiana, determinada pelas enzimas desidrogenase, fosfatase ácida, fosfatase alcalina e urease, aumentava na presença de MOD, mas quando essa estava enriquecida com clortetraciclina, este antibiótico causou a redução da diversidade funcional e da atividade enzimática de todas as enzimas avaliadas; além de aumentar a biodisponibilidade desse fármaco no solo.

Efeito contrário ao observado por Liu et al. (2014) foi verificado por Binh et al. (2007) ao estudarem os efeitos a curto prazo da AMOX sobre às comunidades microbianas de solos adubados da Alemanha. Esses autores ao examinarem dois solos por meio de técnicas moleculares de quantificação e identificação, concluíram que a presença de esterco no solo, além de promover aumento significativo no número de unidades formadoras de colônia (UFC) pode desencadear crescimento no número de bactérias resistentes à AMOX e a outros antibióticos, afetando assim, a estrutura e função de toda comunidade bacteriana.

De um modo geral, esse estudo indicou que classes ou grupos químicos distintos de antibióticos acarretam diferentes impactos à microbiota do solo. Segundo Kotzerke et al. (2011), a AMOX é um fármaco com baixas taxas de recuperação no solo, tem degradação rápida e, conseqüentemente, baixa persistência. Porém, Kim et al. (2012) descreveram que ela é um composto que apresenta baixa retenção, implicando em alta mobilidade, é muito influenciada pelo pH, presença de MO e teores de argila do solo. Apesar do latossolo matriz-objeto deste trabalho apresentar elevada acidez (pH 3,9) – o que favoreceria sua retenção –, o teor de matéria orgânica é médio e este contém uma textura argilosa, condições que dificultam sua sorção neste solo. Esses fatores poderiam fazer com que esse fármaco permanecesse disponível por um tempo maior dissolvido na fração coloidal e, mesmo em pequenas concentrações, desencadearia efeitos significativos nos microrganismos, influenciando negativamente e a curto prazo, a microbiota do solo (Thiele-Bruhn e Beck, 2005; Binh et al. 2007).

Com relação a DOX, o seu efeito sobre os microrganismos do solo poderia ter sido comprometido, retardado ou atenuado. Apesar dela apresentar baixa degradação e um maior tempo de persistência no solo, seguindo o padrão demonstrado pelas tetraciclina, de um modo geral, e devido às interações desse antibiótico com este

tipo de matriz, sob as mesmas condições as quais a AMOX foi exposta, esse fármaco apresenta alta retenção no solo, principalmente na presença de argilominerais como a caulinita e óxidos de ferro (goethita) e alumínio (gibbsita), sendo os dois primeiros, constituintes da sua fração argila. Por esse motivo a DOX acaba permanecendo, na maior parte do tempo em que se encontra inserida no solo, indisponível na fração coloidal; promovendo, dessa forma, pouca ou breve perturbação à microbiota do solo (Thiele-Bruhn e Beck, 2005; Liu et al. 2012; Liu et al., 2014).

O presente estudo mostrou, experimentalmente, que antibióticos como a AMOX e a DOX acarretaram perturbações em alguns indicadores da qualidade microbiana do solo, como os investigados. Contudo, se verificou que esses efeitos são específicos para cada fármaco, não ocorrendo da igual maneira, mesmo se padronizando variáveis como tipo de matriz (neste caso o solo), dosagens e tempo de exposição.

Essas diferenças ocorrem, principalmente, pela forma como esses fármacos interagem com o tipo de matriz a qual estão inseridos, ou seja, devido a características químicas intrínsecas, tempo de persistência e, também, pela forma de dissipação no ambiente (Ma et al., 2014; Regitano e Leal, 2015).

A pesquisa por meio de outros trabalhos com substâncias bioativas, como os antimicrobianos, e analisando outros indicadores merece atenção; e deveriam ser realizados, para entender melhor o efeito que esses compostos podem desempenhar, a curto e longo prazo, sobre os microrganismos presentes no solo, assim, avaliando o seu impacto sobre organismos que destes dependem, incluindo, principalmente, o ser humano.

Conclusão

Os antibióticos AMOX e DOX acarretam perturbações na atividade e biomassa microbianos e quociente metabólico (qCO_2), bioindicadores de qualidade do solo relacionados à sua microbiota. A exposição dos microrganismos do solo à AMOX causou redução da biomassa, pouco ou nenhum efeito sobre a atividade microbiana e aumento do qCO_2 , confirmando um maior estresse aos microrganismos presentes no solo, enquanto que a DOX reduziu a atividade e promoveu pouca influência sobre o carbono da biomassa microbiana e sobre o qCO_2 , demonstrando baixa perturbação à microbiota do solo. Concluíram-se que esses efeitos são específicos para cada fármaco, têm influência dos atributos morfológicos da matriz e não seguem um comportamento ambiental

idêntico, mesmo se padronizando variáveis como tipo de matriz, dosagens e tempo de exposição à essas substâncias.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais-FAPEMIG e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES pela concessão de bolsas de estudo (Mestrado) ao primeiro autor, nos períodos de março/2017 a fevereiro/2018 e março/2018 a fevereiro/2019, respectivamente.

Referências

- Abbas, Z., Akmal, M., Khan, K.S., 2014. Effect of buctril super (Bromoxynil) herbicide on soil microbial biomass and bacterial population. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 1, 9-14.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2018. Resolução - RDC Nº 20, de 05/05/2011. Brasília. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/sngpc/Documentos/2012/RDC%2020%202011.pdf>>. Acesso em: 18 jun. 2018.
- Araújo, G.B., Santos, H.A., Farias, C.E., Viana, D.A.F., Vieira, E.S., Junior, A.M.F., 2015. Detecção de resíduo de antibiótico em leite in natura em laticínio sob inspeção federal. *Scientia Plena* 11, 1-6.
- Bastida, F., Zsolnay, A., Hernández, T., García, C., 2008. Past, present and future of soil quality indices: a biological perspective. *Geoderma* 147, 159-171.
- Belmonte, S.A., Celi, L., Stahel, R.J., Bonifácio, E., Novello, V., Zanini, E., Steenwerth, K.L., 2018. Effect of Long-Term Soil Management on the Mutual Interaction Among Soil Organic Matter, Microbial Activity and Aggregate Stability in a Vineyard. *Pedosphere* 28, 288-298.
- Binh, C.T.T., Heuer, H., Gomes, N.C.M., Kotzerke, A., Fulle, M., Wilke, B-M., Schloter, M., Smalla, K., 2007. Short-term effects of amoxicillin on bacterial communities in manured soil. *FEMS Microbiology Ecology* 62, 290-302.
- Braschi, I., Blasioli, S., Fellet, C., Lorenzini, R., Garelli, A., Pori, M., Giacomini, D., 2013. Persistence and degradation of new β -lactam antibiotics in the soil and water environment. *Chemosphere* 93, 152-159.
- Bu, Q., Shi, W., Yu, G., Huang, J., Wang, B., 2016. Assessing the persistence of pharmaceuticals in the aquatic environment: Challenges and needs. *Emerging Contaminants* 2, 145-147.

- Carvalho, I.T., Santos, L., 2016. Antibiotics in the aquatic environments: a review of the European scenario. *Environment International* 94, 736-757.
- Caselani, K., 2014. Resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR* 17, 187-195.
- Cetecioglu, Z., Ince, B., Ince, O., Orhon, D., 2015. Acute effect of erythromycin on metabolic transformations of volatile fatty acid mixture under anaerobic conditions. *Chemosphere* 124, 129-135.
- Chowdhury, A., Pradhan, S., Saha, M., Sanyal, N., 2008. Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies. *Indian Journal of Microbiology* 48, 114-127.
- Christian, T., Schneider, R.J., Färber, H.A., Skutlarek, D., Meyer, M.T., Goldbach, H.E., 2003. Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters. *Acta hydrochimica et hydrobiologica* 31, 36-44.
- Cui, H., Wang, S.-P., Fu, J., Zhou, Z.-Q., Zhang, N., Guo, L., 2014. Influence of ciprofloxacin on microbial community structure and function in soils. *Biology and Fertility of Soils* 50, 939-947.
- Das, P., Pal, R., Chowdhury, A., 2007. Effect of novaluron on microbial biomass, respiration, and fluorescein diacetate-hydrolyzing activity in tropical soils. *Biology and Fertility of Soils* 44, 387-391.
- De Franco, M.A.E., De Carvalho, C.B., Bonetto, M.M., Soares, R.P., Féris, L.A., 2017. Removal of amoxicillin from water by adsorption onto activated carbon in batch process and fixed bed column: Kinetics, isotherms, experimental design and breakthrough curves modelling. *Journal of Cleaner Production* 161, 947-956.
- De-Polli, H., Guerra, J.G.M., 1996. Biomassa microbiana: perspectivas para o uso e manejo do solo. In: Alvarez V.H.V., Fontes, L.E.F., Fontes, M. P. (Eds.), *O solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil*. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, pp. 552-564.
- Dinh, Q.T., Moreau-Guigon, E., Labadie, P., Alliot F., Teil, M.-J., Blanchard, M., Chevreuil, M., 2017. Occurrence of antibiotics in rural catchments. *Chemosphere* 168, 483-490.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2006. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. Rio de Janeiro.
- Ferreira, A.S., Camargo, F.A.O., Vidor, C., 1999. Utilização de microondas na avaliação da biomassa microbiana do solo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 23, 991-996.
- Gao, M., Song, W., Zhou, Q., Ma, X., Chen, X., 2013. Interactive effect of oxytetracycline and lead on soil enzymatic activity and microbial biomass. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36, 667-674.
- Gavrilescu, M., Demnerová, K., Aamand, J., Aghatos, S., Fava, F., 2015. Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. *New Biotechnology* 32, 147-156.
- Gomez, E., Ferreras, L., Lovotti, L., Fernandez, E., 2009. Impact of glyphosate application on microbial biomass and metabolic activity in a Vertic Argiudoll from Argentina. *European Journal of Soil Biology* 45, 163-167.
- Gonzalez-Martinez, A., Margareto, A., Rodriguez-Sanchez A., Pesciaroli, C., Diaz-Cruz, S., Barcelo, D., Vahala, R., 2018. Linking the Effect of Antibiotics on Partial-Nitritation Biofilters: Performance, Microbial Communities and Microbial Activities. *Frontiers in Microbiology* 9, 1-16.
- Grenni, P., Ancona, V., Caracciolo, A.B., 2017. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. *Microchemical Journal* 136, 25-39.
- Guo, H., Yao, J., Cai, M., Quian, Y., Guo, Y., Richnow, H.H., Blake, R.E., Doni, S., Ceccanti, B., 2012. Effects of petroleum contamination on soil microbial numbers, metabolic activity and urease activity. *Chemosphere* 87, 1273-1280.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. Paleontological statistics software: package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4, 19-20.
- Imfeld, G., Vuilleumier, S., 2012. Measuring the effects of pesticides on bacterial communities in soil: a critical review. *European Journal of Soil Biology* 49, 22-30.
- Kim, Y.K., Lim, S., Han, M., Cho, J., 2012. Sorption characteristics of oxytetracycline, amoxicillin, and sulfathiazole in two different soil types. *Geoderma* 185-186, 97-101.
- Kotzerke, A., Fulle, M., Sharma, S., Kleineidam, K., Welzl, G., Lamshöft, M., Schloter, M., Wilke, B.-M., 2011. Alterations in total microbial activity and nitrification rates in soil due to amoxicillin-spiked pig manure. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 174, 56-64.
- Kuppusamy, S., Kakarla, D., Venkateswarlu, K., Megharaj, M., Yoon, Y.-E., Lee, Y.B., 2018. Veterinary antibiotics (VAs) contamination as a global agro-ecological issue: A critical view. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 257, 47-59.

- Liao, M., Xie, X., Ma, A., Peng, Y., 2010. Different influences of cadmium on soil microbial activity and structure with Chinese cabbage cultivated and non-cultivated. *Journal of Soils and Sediments* 10, 818-826.
- Lin, H., Jin, D., Freitag, T.E., Sun, W., Yu, Q., Fu, J., Ma, J., 2016. A compositional shift in the soil microbiome induced by tetracycline, sulfamonomethoxine and ciprofloxacin entering a plant-soil system. *Environmental Pollution* 212, 440-448.
- Liu, A., Cao, H., Yang, Y., Ma, X., Liu, X., 2016. Combinational effects of sulfamethoxazole and copper on soil microbial community and function. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 4235-4241.
- Liu, B., Li, Y., Zhang, X., Wang, J., Gao, M., 2014. Combined effects of chlortetracycline and dissolved organic matter extracted from pig manure on the functional diversity of soil microbial community. *Soil Biology and Biochemistry* 74, 148-155.
- Liu, F., Wu, J., Ying, G-G., Luo, Z., Feng, H., 2012. Changes in functional diversity of soil microbial community with addition of antibiotics sulfamethoxazole and chlortetracycline. *Applied Microbiology and Biotechnology* 95, 1615-1623.
- Lv, T., Zhang, Y., Carvalho, P.N., Zhang, L., Button, M., Arias, C.A., Weber, K.P., Brix, H., 2017. Microbial community metabolic function in constructed wetland mesocosms treating the pesticides imazalil and tebuconazole. *Ecological Engineering* 98, 378-387.
- Ma, J., Lin, H., Sun, W., Wang, Q., Yu, Q., Zhao, Y., Fu, J., 2014. 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* 21, 7436-7448.
- Ma, T., Pan, X., Chen, L., Liu, W., Christie, P., Luo, Y., Wu, L., 2016. Effects of different concentrations and application frequencies of oxytetracycline on soil enzyme activities and microbial community diversity. *European Journal of Soil Biology* 76, 53-60.
- Mah, T-F., 2012. Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiology* 7, 1061-1072.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2018. Exportações do Agro em maio alcançaram 9,97 bilhões. Brasília. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/noticias/exportacoes-do-agro-em-maio-alcancaram-us-9-97-bilhoes>. Acesso em: 18 jun. 2018.
- Molaei, A., Lakzian, A., Haghnia, G., Astaraei, A., Rasouli-Sadaghiani, M., Ceccherini, M.T., Datta, R., 2017. Assessment of some cultural experimental methods to study the effects of antibiotics on microbial activities in a soil: An incubation study. *PloS One* 12, e0180663.
- Montagner, C.C., Vidal, C., Acayaba, R.D., 2017. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. *Química Nova* 40, 1094-1110.
- Muhlbachova, G., Sagova-Mareckova, M., Omelka, M., Szakova, J., Tlustos, P., 2015. The influence of soil organic carbon on interactions between microbial parameters and metal concentrations at a long-term contaminated site. *Science of the Total Environment* 502, 218-223.
- Mukherjee, S., Tripathi, S., Mukherjee, A.K., Bhattacharyya, A., Chakrabarti, K., 2016. Persistence of the herbicides florasulam and halauxifen-methyl in alluvial and saline alluvial soils, and their effects on microbial indicators of soil quality. *European Journal of Soil Biology* 73, 93-99.
- Nascimento, V.A., Batista Filho, M., Dias, M., 2016. Evolução do efetivo de bovinos no Brasil, estado de Goiás e município de Jataí (GO). *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer* 13, 610-624.
- Oliveira Neto, O.F., Arenas, A.Y., Fostier, A.H., 2017. Sorption of thiabendazole in sub-tropical Brazilian soils. *Environmental Science and Pollution Research* 24, 16503-16512.
- Pacheco-Silva, E., Souza, J.R., Caldas, E.D., 2014. Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos. *Química Nova* 37, 111-122.
- Peixoto, F.B.S., Peixoto, J.C.C., De Assunção, E. N., Peixoto, E.M., Pereira, J.O., Astolfi-Filho, S., 2017. Petroleum biodegrading and co-resistance to antibiotics by *Serratia marcescens* strain isolated in Coari, Amazonas. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 39, 489-496.
- Peña, W., Trasar-Cepeda, C., Gil-Sotres, F., Leirós, M.C., 2007. Modification of the degradative capacity of a soil artificially contaminated with diesel. *Chemosphere* 67, 1057-1063.
- Perovano Filho, N., Da Silva, K.F.S., López, A. M.Q., 2011. Ação de Micoflora de efluentes agroindustriais sobre diferentes corantes e substratos lignocelulósicos. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 33, 427-435.
- Portilho, I.I.R., Scorza Junior, R.P., Salton, J.C., Mendes, I.C., Mercante, F.M., 2015. Persistência de inseticidas e parâmetros microbiológicos em solo sob sistemas de manejo. *Ciência Rural* 45, 22-28.

- Puckowski, A., Mioduszewska, K., Łukaszewicz, P., Borecka, M., Caban, M., Maszkowska J., Stepnowski, P., 2016. Bioaccumulation and analytics of pharmaceutical residues in the environment: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 127, 232-255.
- Qin, J., Xiong H., Ma, H., Li, Z., 2018. Effects of different fertilizers on residues of oxytetracycline and microbial activity in soil. *Environmental Science and Pollution Research* 11/2018, 1-10.
- Quadro, M.S., Castilhos, D.D., Castilhos, R.M.V., Vivian, G., 2011. Biomassa e atividade microbiana em solo acrescido de dejetos suíno. *Current Agricultural Science and Technology* 17, 85-93.
- Rath, S., Schroder, C.H.K., Silva, C.R., Ferreira, F.O., Dionizio, A.C., Dal Bosco, S.M., 2016. Avermectinas no agronegócio brasileiro: uma solução ou um problema? *Veterinária e Zootecnia* 23, 8-24.
- Regitano, J.B., Leal, R.M.P., 2015. Dinâmica de antibióticos e hormônios no Solo. In: *Do Nascimento, C.W.A., Souza Júnior, V.S.S., Freire, M.B.G.S., De Souza, E.R. (Eds.), Tópicos em Ciência do Solo V. 9. SBCS, Viçosa, pp. 48-91.*
- Reichel, R., Rosendahl, I., Peeters, E.T.H.M., Focks, A., Groeneweg, J., Bierl, R., Schlichting, A., Amelung W., Thiele-Bruhn, S., 2013. Effects of slurry from sulfadiazine-(SDZ) and difloxacin-(DIF) medicated pigs on the structural diversity of microorganisms in bulk and rhizosphere soil. *Soil Biology and Biochemistry* 62, 82-91.
- Reichel, R., Radl, V., Rosendahl, I., Albert, A., Amelung, W., Schlöter, M., Thiele-Bruhn, S., 2014. Soil microbial community responses to antibiotic-contaminated manure under different soil moisture regimes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98, 6487-6495.
- Reis, M.R., Silva, A.A., Costa, M.D., Guimarães, A.A., Ferreira, E.A., Santos, J.B., Cecon, P.R., 2008. Atividade microbiana em solo cultivado com cana-de-açúcar após aplicação de herbicidas. *Planta Daninha* 26, 323-331.
- Rezende, L.G.P., 2019. Comportamento físico-químico e biológico de antibióticos em um Latossolo Vermelho-amarelo da região sul do Estado de Minas Gerais. *Dissertação (Mestrado), Itajubá, UNIFEI.*
- Rivera-Utrilla, J., Sánchez-Polo, M., Ferro-García, M.A., Prados-Joya, G., Ocampo-Pérez, R., 2013. Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. *Chemosphere* 93, 1268-1287.
- Sam, A.T., Asuming-Brempong, S., Nartey, E.K., 2017. Microbial activity and metabolic quotient of microbes in soils amended with biochar and contaminated with atrazine and paraquat. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B – Soil & Plant Science* 67, 492-509.
- Shapiro, S.S., Wilk, M.B., 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52, 591-611.
- Shore, R.F., Taggart, M.A., Smits, J., Mateo, R., Richards, N.L., Fryday, S., 2014. Detection and drivers of exposure and effects of pharmaceuticals in higher vertebrates. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 369, 20130570.
- SINDAN. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal, 2018. Anuário 2018. São Paulo. Disponível em: <<http://www.sindan.org.br/anuario2018/>>. Acesso em: 29 dez. 2018.
- Souza, C.P.F.A., Falqueto, E., 2015. Descarte de medicamentos no meio ambiente no Brasil. *Revista Brasileira de Farmácia* 96, 1142-1158.
- Souza, M.I.A., Lage, M.E., Prado, C.S., 2013. Resíduos de antibióticos em carne bovina. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer* 9, 1917-1938.
- Stotzky, G. Microbial respiration, 1965. In: Black, C.A. (Ed.), *Methods of Soil Analysis. Part 2. American Society of Agronomy, Madison, pp. 1550-1572.*
- Thiele-Bruhn, S., Beck, I-C., 2005. Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass. *Chemosphere* 59, 457-465.
- Tironi, S.P., Belo, A.F., Fialho, C.M.T., Galon, L., Ferreira, E.A., Silva, A.A., Costa, M.D., Barbosa, M.H.P., 2009. Efeito de herbicidas na atividade microbiana do solo. *Planta Daninha* 27, 995-1004.
- Vasquez, M.I., Lambrianides, A., Schneider, M., Kümmerer, K., Fatta-Kassinos, D., 2014. Environmental side effects of pharmaceutical cocktails: what we know and what we should know. *Journal of Hazardous Materials* 279, 169-189.
- Waiser, M.J., Swerhone, G.D.W., Roy, J., Tumber, V., Lawrence, J.R., 2016. Effects of erythromycin, trimethoprim and clindamycin on attached microbial communities from an effluent dominated prairie stream. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 132, 31-39.
- Wang, J., Wang, L., Zhu, L., Wang, J., 2018a. Individual and combined effects of enrofloxacin and cadmium on soil microbial biomass and the

- ammonia-oxidizing functional gene. *Science of The Total Environment* 624, 900-907.
- Wang, L., Wang, J., Zhu, L., Wang, J., 2018b. Toxic effects of oxytetracycline and copper, separately or combined, on soil microbial biomasses. *Environmental Geochemistry and Health* 40, 763-776.
- Willing, B.P., Russell, S.L., Finlay, B.B., 2011. Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualism. *Nature Reviews Microbiology* 9, 233.
- Xu, Y., Yu, W., Ma, Q., Wang, J., Zhou, H., Jiang, C., 2016. The combined effect of sulfadiazine and copper on soil microbial activity and community structure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 134, 43-52.
- Zhang, C., Liu, X., Dong, F., Xu, J., Zheng, Y., 2010. The effect of imazethapyr on soil microbes in soybean fields in northeast China. *Chemistry and Ecology* 26, 173-182.
- Zhang, X., Li, F., Liu, T., Xu, C., Duan, D., Peng, C., Zhu, S., Shi, J., 2013. The variations in the soil enzyme activity, protein expression, microbial biomass, and community structure of soil contaminated by heavy metals. *ISRN Soil Science*, 2013, 1-12.