

Universidade Federal de São Carlos  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Influência dos antimicrobianos oxitetraciclina e imazalil sobre a  
decomposição da macrófita aquática *Egeria najas* Planch

Helena Janke

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutora em Ciências. Área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais.

Orientadora: Profa. Dra. Mirna Helena Regali Seleghim

Coorientadora: Profa. Dra. Marcela Bianchessi da Cunha Santino

São Carlos

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

J33ia

Janke, Helena.

Influência dos antimicrobianos oxitetraciclina e imazalil sobre a decomposição da macrófita aquática *Egeria najas* Planch / Helena Janke. -- São Carlos : UFSCar, 2015.  
102 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Ecologia aquática. 2. Macrófitas aquáticas. 3. Decomposição. 4. Agentes antimicrobianos. 5. Microorganismos. I. Título.

CDD: 574.5263 (20<sup>a</sup>)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Helena Janke, realizada em 27/05/2015:

---

Prof. Dra. Mirna Helena Regali Seleglim  
UFSCar

---

Prof. Dr. Irineu Bianchini Junior  
UFSCar

---

Prof. Dra. Odete Rocha  
UFSCar

---

Prof. Dra. Isabel Kimiko Sakamoto  
USP

---

Prof. Dra. Sílvia Helena Govoni Brondi  
CEDIN

## **Agradecimentos**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo concedida (Processo nº. 143400/2011-8).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio ao projeto *Influência dos antibióticos oxitetraciclina e imazalil na diversidade e funções ecológicas microbianas em ambiente aquático* (Processo nº. 2013/02989-0).

À Comissão Técnico-Científica (COTEC) do Instituto Florestal, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo pela permissão de acesso à Estação Ecológica do Jataí (Carta nº. 562/2013 D98/2013 AP).

Aos funcionários do PPG-ERN/ UFSCar pelo apoio ao desenvolvimento do meu doutorado.

Aos professores do PPG-ERN/ UFSCar pela minha formação acadêmica e especialmente à Profa. Dra. Suzana Trivinho Strixino por, ainda na época de minha graduação, ter me mostrado o quanto é apaixonante ser bióloga.

À Profa. Dra. Mirna Helena Regali Seleglim pela orientação, confiança e oportunidade de realizar este trabalho.

À Profa. Dra. Marcela Bianchessi da Cunha Santino pela coorientação, disponibilidade e atenção em todas as etapas do meu doutorado.

À Profa. Dra. Eny Maria Vieira pela parceria e por ter disponibilizado a infraestrutura necessária para o desenvolvimento de parte deste projeto. Agradeço pela receptividade e carinho ao longo de todo tempo que estive em seu laboratório.

À Profa. Dra. Maria Bernadete A. Varesche por ter prontamente aceito colaborar com o projeto e por ter disponibilizado a infraestrutura necessária para o desenvolvimento de parte deste trabalho.

Ao Prof. Armando A. H. Vieira e ao pessoal do Laboratório de Ficologia da UFSCar pela ajuda, permitindo o uso de equipamento e livre acesso ao laboratório.

Ao Dr. Carlos Alexandre Galinaro pelos ensinamentos na área de química analítica.

À Dra. Isabel Kimiko Sakamoto pela atenção e por ter me acompanhado ativamente nas análises de biologia molecular.

Ao Prof. Dr. Irineu Bianchini Jr. pelas contribuições indispensáveis ao meu trabalho.

Ao técnico Luiz Aparecido Joaquim por ter me acompanhado desde o mestrado nos trabalhos de campo e por ter contribuído imensamente com a minha formação da área da Ecologia.

Aos colegas do Laboratório de Ecologia de Microrganismos Aquáticos, em especial ao Popinho, Mayara e Adrislaine, pelas conversas, amizade e ajuda durante meu doutorado.

Aos colegas do Laboratório de Bioensaios e Modelagem Matemática, em especial Mari Duó, Bryan e Adriano, pela ajuda e esclarecimentos.

Aos colegas do Laboratório de Química Analítica, Ambiental e Ecotoxicologia, em especial Silvia, Dalva, Tiago e Mariangela, por terem me recebido como integrante do grupo e por toda amizade enquanto estive no laboratório.

Aos colegas do Laboratório de Processos Biológicos, em especial Juliana e Laís, por toda ajuda e incentivo.

Aos velhos e novos amigos de São Carlos que estiveram comigo ao longo desses anos.

À minha grande parceira de trabalho e amiga do peito Zaryf por ter estado ao meu lado em todos os bons e maus momentos. Obrigada por ter feito deste longo caminho um percurso mais suave.

Aos meus pais, Ewald e Célia, por incentivarem e compreenderem as minhas escolhas sem questionamentos. Amo vocês infinitamente.

Às minhas irmãs, Nadja e Tatiana, pelo amor, ouvidos e conselhos.

Ao meu eterno companheiro Diego.

## Resumo

Os resíduos de compostos farmacêuticos, em especial os antimicrobianos, estão entre os mais preocupantes contaminantes ambientais da atualidade. A contaminação do ambiente por resíduos desses compostos é um fato preocupante devido aos potenciais efeitos negativos sobre microrganismos que desempenham importante papel nos processos, dinâmica e estabilidade dos ecossistemas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação de compostos antimicrobianos oxitetraciclina (OTC) e imazalil (IMZ) sobre a decomposição de detritos da macrófita aquática *Egeria najas* Planch em bioensaios laboratoriais. Foram preparadas câmaras de decomposição contendo fragmentos secos da macrófita *E. najas* e água coletados na Represa do Beija-Flor, localizada na Estação Ecológica do Jataí, município de Luiz Antônio (São Paulo). As incubações foram preparadas com: água e macrófita; água acrescida de OTC e macrófita; água acrescida de IMZ e macrófita; água acrescida da mistura de OTC e IMZ e a macrófita. Para acompanhar o decaimento de OTC em água também foram preparadas incubações sem a adição da planta. As incubações foram mantidas a 21 °C, no escuro, em duas condições experimentais: aeróbia e anaeróbia. Nos tempos de amostragem (1, 3, 5, 15, 35 e 65 dias após o estabelecimento dos experimentos), foram determinados o pH e a condutividade elétrica. Na fração dissolvida foram analisadas as concentrações de carbono orgânico dissolvido (COD), nitrogênio total (NT) e OTC. Na fração aquosa foram analisados os perfis da diversidade bacteriana por Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) e foi feita a contagem de células bacterianas por microscopia de epifluorescência. Foi adotado o modelo cinético de primeira ordem para descrever e comparar a cinética da decomposição da macrófita nos diferentes tratamentos. Os resultados mostraram que a decomposição da fração refratária e a mineralização do COD nas câmaras de decomposição contendo o antimicrobiano OTC foram mais lentas do que a do controle, para a condição aeróbia. Nas câmaras anaeróbias não foi observada alteração em relação às taxas de decomposição, nos diferentes tratamentos. A ação da OTC não foi mais efetiva devido a adsorção do composto (entre 61 e 65%) ao material vegetal particulado. De acordo com os perfis de DGGE obtidos para o Domínio Bacteria, a comunidade bacteriana nos bioensaios de decomposição foi modificada ao longo do tempo de experimento e de acordo com o tratamento. A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, conclui-se que a presença de antimicrobianos em água pode alterar a velocidade de decomposição de material vegetal detrital, dependendo das condições ambientais.

## **Abstract**

The pharmaceutical compounds residues, especially antibiotics, are among the most worrying emerging environmental contaminants. These residues potentially cause negative effects on microorganisms that play an important role in the ecosystems processes, dynamics and stability. The objective of this study was to evaluate the oxytetracycline (OTC) (against bacterium) and imazalil (IMZ) (against fungus) action on the aquatic macrophyte *Egeria najas* Planch decomposition in laboratory bioassays. Microcosm experiments were performed in borosilicate flasks, in triplicate, containing fragments of *E. najas* and water collected in Beija-Flor Reservoir, Jataí Ecological Station, Luiz Antônio, São Paulo, Brazil. The experiments were performed as follows: water and macrophyte; water with OTC and macrophyte; water with IMZ and macrophyte; water with a mixture of OTC and IMZ and the macrophyte. The OTC decay in water was also analyzed in microcosm without plant detritus addition. The experiments were kept in the dark, at 21 °C, in two experimental conditions: aerobic and anaerobic. Water pH and electrical conductivity of the systems were measured at the sampling times (1, 3, 5, 15, 35 and 65 days after the onset of the experiments). Dissolved organic carbon (DOC), total nitrogen (TN) and OTC were analyzed in the dissolved fraction. Bacterial diversity was evaluated by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and bacterial cell number counted by epifluorescence microscopy in the aqueous portion. A first-order kinetic model was adopted to describe and compare macrophyte decomposition at different treatments. The results showed that the refractory fraction decomposition and the DOC mineralization were lower in experiments containing antimicrobial OTC than in control experiments in aerobic conditions. Changes in decomposition rates were not observed in anaerobic conditions. The OTC action was not effective due to its adsorption to particulate plant material (between 61 and 65%). According to the DGGE profiles obtained for the Bacteria Domain, the bacterial community in bioassays has been modified throughout the experiment time and according to the treatment. From these results, it was concluded that antimicrobial agents can alter the rate of decomposition of detrital plant material in water, depending on environmental conditions.

## Lista de Figuras

Figura 1.1 – Rotas de exposição de fármacos no ambiente. Modificado de Halling-Sorensen et al. (1998).....	5
Figura 1.2 – Fontes e distribuição de fármacos no ambiente. Modificado de Hirsch et al. (1999).....	5
Figura 2.1 – Principais elos da teia alimentar microbiana e sua relação com os metazoários. Modificado de Sherr e Sherr (1988).....	14
Figura 2.2 – Fluxo entre os estoques de carbono orgânico e inorgânico entre os ecossistemas aquáticos e ambiente externo. CID = carbono inorgânico dissolvido, CO = carbono orgânico, COP = carbono orgânico particulado, COD = carbono orgânico dissolvido, CO <sub>2</sub> = dióxido de carbono. Modificado de Vidal et al. (2005).....	15
Figura 2.3 – Localização e abrangência atual da Estação Ecológica do Jataí (EEJ) no município de Luiz Antônio, estado de São Paulo. Modificado de Guerreschi (2004).....	19
Figura 2.4 – Localização da represa do Beija-Flor na EEJ e pontos de coleta. Modificado de Ferreira-Peruquetti e Fonseca-Gessner (2003). Fotos: Helena Janke.....	20
Figura 2.5 – (a) Foto de exemplar de <i>E. najas</i> . Extraído de <a href="http://www.herbariovirtualreflora.jbrj.gov.br/jabot/herbarioVirtual/ConsultaPublicoHVUC/ConsultaPublicoHVUC.do?idTestemunho=2256466">http://www.herbariovirtualreflora.jbrj.gov.br/jabot/herbarioVirtual/ConsultaPublicoHVUC/ConsultaPublicoHVUC.do?idTestemunho=2256466</a> . Acesso em: 16 jul. 2015. (b) Esquema de um ramo de <i>Egeria</i> sp em fase reprodutiva, em detalhe a flor masculina e feminina. Extraído de <a href="http://idtools.org/id/aquariumplants/Aquarium_&amp;_Pond_Plants_of_the_World/key/Aquarium_&amp;_Pond_Plants/Media/Html/Fact_sheets/egeria.html">http://idtools.org/id/aquariumplants/Aquarium_&amp;_Pond_Plants_of_the_World/key/Aquarium_&amp;_Pond_Plants/Media/Html/Fact_sheets/egeria.html</a> . Acesso em: 16 jul. 2015.....	21
Figura 2.6 – Fórmula estrutural, fórmula empírica, número CAS (Chemical Abstracts Service) e peso molecular da Oxitetraciclina. Extraído de: <a href="http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/o040000?lang=pt&amp;region=BR">http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/o040000?lang=pt&amp;region=BR</a> . Acesso em: 21 fev. 2015.....	23
Figura 2.7 – Fórmula estrutural, fórmula empírica, número CAS (Chemical Abstracts Service) e peso molecular do imazalil. Extraído de: <a href="http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/32007?lang=pt&amp;region=BR">http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/32007?lang=pt&amp;region=BR</a> . Acesso em: 21 fev. 2015.....	24
Figura 2.8 – Resumo esquemático dos tratamentos dos bioensaios de decomposição de <i>E. najas</i> e análises realizadas em cada tempo amostral.....	30
Figura 2.9 – Modelo cinético proposto para a decomposição de <i>E. najas</i> . Modificado de Bianchini Júnior e Cunha-Santino (2008). Em que: COP <sub>LS</sub> = carbono orgânico particulado lábil/solúvel; COP <sub>R</sub> = carbono orgânico particulado refratário; COD = carbono orgânico dissolvido; k <sub>1</sub> = coeficiente de mineralização do COP <sub>L</sub> ; k <sub>2</sub> = coeficiente de lixiviação do COP <sub>LS</sub> (igual à taxa de formação do COD); k <sub>LS</sub> = coeficiente global de decaimento do COP <sub>LS</sub> (= k <sub>1</sub> + k <sub>2</sub> ); k <sub>3</sub> = coeficiente de mineralização do COD; k <sub>R</sub> = coeficiente de mineralização do COP <sub>R</sub> ; CM <sub>1</sub> = carbono mineralizado através da rota 1 (oxidação direta); CM <sub>2</sub> = carbono mineralizado através da rota 2 (oxidação dos solubilizados) e CM <sub>3</sub> = carbono mineralizado através da rota 3 (oxidação da fração refratária).....	31
Figura 2.10 – Variação do pH ao longo do tempo para os bioensaios de decomposição aeróbia e decomposição anaeróbia. Tratamento 1 = Controle, Tratamento 2 = Adição de OTC, Tratamento 3 = Adição de IMZ, Tratamento 4 = Adição de mistura de OTC e IMZ.....	39
Figura 2.11 – Variação da condutividade elétrica ao longo do tempo para os bioensaios de decomposição aeróbia e decomposição anaeróbia. Tratamento 1 = Controle, Tratamento 2 = Adição de OTC, Tratamento 3 = Adição de IMZ, Tratamento 4 = Adição de mistura de OTC e IMZ.....	41



Figura 2.12 – Variação de nitrogênio total dissolvido ao longo do tempo para os bioensaios de decomposição aeróbia e decomposição anaeróbia. Tratamento 1 = Controle, Tratamento 2 = Adição de OTC, Tratamento 3 = Adição de IMZ, Tratamento 4 = Adição de mistura de OTC e IMZ.....	44
Figura 2.13 – Variações temporais de carbono em porcentagem para carbono orgânico particulado (COP), carbono orgânico dissolvido (COD) e carbono mineralizado (CM), para os bioensaios de decomposição aeróbia e decomposição anaeróbia. Tratamento 1 = Controle, Tratamento 2 = Adição de OTC, Tratamento 3 = Adição de IMZ, Tratamento 4 = Adição de mistura de OTC e IMZ.....	46
Figura 2.14 – Análise de agrupamento por UPGMA do perfil das bandas de DGGE dos fragmentos de rARN 16S para o Domínio Bacteria de amostras dos bioensaios de decomposição aeróbia. T1 = tempo 1 dia, T15 = tempo 15 dias, T65 = tempo 65 dias. Trat = tratamento. Trat1 = Controle, Trat 2 = Adição de OTC, Trat 3 = Adição de IMZ, Trat 4 = Adição de mistura de OTC e IMZ.....	53
Figura 2.15 – Análise de agrupamento por UPGMA do perfil das bandas de DGGE dos fragmentos de rARN 16S para o Domínio Bacteria de amostras dos bioensaios de decomposição anaeróbia. T1 = tempo 1 dia, T15 = tempo 15 dias, T65 = tempo 65 dias. Trat = tratamento. Trat1 = Controle, Trat 2 = Adição de OTC, Trat 3 = Adição de IMZ, Trat 4 = Adição de mistura de OTC e IMZ.....	53
Figura 2.16 – Densidade bacteriana para as amostras dos bioensaios de decomposição aeróbia. Tratamento 1 = Controle, Tratamento 2 = Adição de OTC, Tratamento 3 = Adição de IMZ, Tratamento 4 = Adição de mistura de OTC e IMZ.....	54
Figura 2.17 – Densidade bacteriana para as amostras dos bioensaios de decomposição anaeróbia. Tratamento 1 = Controle, Tratamento 2 = Adição de OTC, Tratamento 3 = Adição de IMZ, Tratamento 4 = Adição de mistura de OTC e IMZ.....	55
Figura 3.1 – Etapas da EFS do composto OTC em amostras de água.....	64
Figura 3.2 – Resumo esquemático dos tratamentos do experimento de decaimento de OTC e análises realizadas em cada tempo amostral.....	65
Figura 3.3 – Cromatograma CLAE-DAD da recuperação de OTC em água enriquecida com 0,25 µg L <sup>-1</sup> , sendo (a) matriz água obtida do experimento piloto; (b) água Milli-Q.....	66
Figura 3.4 – Cromatograma CLAE-DAD da recuperação de OTC em água enriquecida com 1,0 µg L <sup>-1</sup> , sendo (a) matriz água obtida do experimento piloto; (b) água Milli-Q.....	67
Figura 3.5 – Cromatograma CLAE-DAD da recuperação de OTC em água enriquecida com 2,5 µg L <sup>-1</sup> , sendo (a) matriz água obtida do experimento piloto; (b) água Milli-Q.....	68
Figura 3.6 – Curva analítica para OTC em matriz água.....	69
Figura 3.7 – Variação do pH ao longo do tempo para as condições aeróbia e anaeróbia. Tratamento 5 = Adição de OTC, Tratamento 6 = Adição de mistura de OTC e IMZ, Tratamento 7 = Controle.....	70
Figura 3.8 – Variação temporal da CE ao longo do tempo para as condições aeróbia e anaeróbia. Tratamento 5 = Adição de OTC, Tratamento 6 = Adição de mistura de OTC e IMZ, Tratamento 7 = Controle.....	71
Figura 3.9 – Variação do COD ao longo do tempo para as condições aeróbia e anaeróbia. Tratamento 5 = Adição de OTC, Tratamento 6 = Adição de mistura de OTC e IMZ, Tratamento 7 = Controle.....	72
Figura 3.10 – Variação temporal da OTC ao longo do tempo para as condições aeróbia e anaeróbia. Tratamento 5 = Adição de OTC, Tratamento 6 = Adição de mistura de OTC e IMZ.....	72

## Lista de Tabelas

- Tabela 2.1 – Meios de cultura e concentrações dos antimicrobianos OTC e IMZ utilizados para avaliação da sensibilidade da comunidade microbiana heterotrófica das águas da Represa do Beija-Flor, para os pontos de coleta I, II e III. Em que: AN = ágar nutriente; CPS = ágar *Casein-Peptone-Starch*; AS = ágar Sabouraud; DRBC = ágar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol.....26
- Tabela 2.2 – *Primers* para amplificação da região 16S do rARN (ácido ribonucleico ribossomal) para o Domínio Bacteria (NÜBEL et al., 1996).....34
- Tabela 2.3 – Programação do termociclador para amplificação do rARN (ácido ribonucleico ribossomal) 16S para o Domínio Bacteria (NÜBEL et al., 1996).....35
- Tabela 2.4 – Valores das variáveis limnológicas medidas nos três pontos amostrais: pH; OD = oxigênio dissolvido ( $\text{mg L}^{-1}$ ); turbidez (UNT); DBO = demanda bioquímica por oxigênio ( $\text{mg L}^{-1}$ ); PT = fósforo total ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ); temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ); NT = nitrogênio total ( $\text{mg L}^{-1}$ ); COT = Carbono Orgânico Total ( $\text{mg L}^{-1}$ ). dp = desvio-padrão.....37
- Tabela 2.5 – Coeficiente de correlação intraclasse (CCI) para os meios de cultura de crescimento bacteriano (AN e CPS) e para os meios de cultura de crescimento fúngico (AS e DRBC), utilizando os resultados de unidades formadoras de colônia (UFC).....38
- Tabela 2.6 – Parametrização do modelo cinético de decomposição aeróbia de *E. najas*. Em que:  $\text{COP}_{\text{LS}}$  = carbono orgânico particulado lábil/solúvel,  $k_{\text{LS}}$  = coeficiente de decaimento do  $\text{COP}_{\text{LS}}$ ,  $k_1$  = coeficiente de mineralização das frações lábeis,  $\text{COP}_{\text{R}}$  = carbono orgânico particulado refratário,  $k_{\text{R}}$  = coeficiente de mineralização do  $\text{COP}_{\text{R}}$ , COD = carbono orgânico dissolvido,  $k_2$  = coeficiente de lixiviação (referente à taxa de formação do COD),  $k_3$  = coeficiente de mineralização do COD,  $\text{CM}_1$  = carbono mineralizado através da oxidação direta (rota 1);  $\text{CM}_2$  = carbono mineralizado através da oxidação dos solubilizados (rota 2);  $\text{CM}_3$  = carbono mineralizado através da oxidação da fração refratária (rota 3),  $t_{1/2}$  = tempo de meia-vida;  $r^2$  = coeficiente de ajuste do modelo. Tratamento 1 = Controle, Tratamento 2 = Adição de OTC, Tratamento 3 = Adição de IMZ, Tratamento 4 = Adição de mistura de OTC e IMZ.....47
- Tabela 2.7 – Parametrização do modelo cinético de decomposição anaeróbia de *E. najas*. Em que:  $\text{COP}_{\text{LS}}$  = carbono orgânico particulado lábil/solúvel,  $k_{\text{LS}}$  = coeficiente de decaimento do  $\text{COP}_{\text{LS}}$ ,  $k_1$  = coeficiente de mineralização das frações lábeis,  $\text{COP}_{\text{R}}$  = carbono orgânico particulado refratário,  $k_{\text{R}}$  = coeficiente de mineralização do  $\text{COP}_{\text{R}}$ , COD = carbono orgânico dissolvido,  $k_2$  = coeficiente de lixiviação (referente à taxa de formação do COD),  $k_3$  = coeficiente de mineralização do COD,  $\text{CM}_1$  = carbono mineralizado através da oxidação direta (rota 1);  $\text{CM}_2$  = carbono mineralizado através da oxidação dos solubilizados (rota 2);  $\text{CM}_3$  = carbono mineralizado através da oxidação da fração refratária (rota 3),  $t_{1/2}$  = tempo de meia-vida;  $r^2$  = coeficiente de ajuste do modelo. Tratamento 1 = Controle, Tratamento 2 = Adição de OTC, Tratamento 3 = Adição de IMZ, Tratamento 4 = Adição de mistura de OTC e IMZ.....48
- Tabela 2.8 – Concentração e pureza do ADN extraído a partir de amostras dos bioensaios de decomposição aeróbia. Tratamento 1 = Controle, Tratamento 2 = Adição de OTC, Tratamento 3 = Adição de IMZ, Tratamento 4 = Adição de mistura de OTC e IMZ.....51
- Tabela 2.9 – Concentração e pureza do ADN extraído a partir de amostras dos bioensaios de decomposição anaeróbia. Tratamento 1 = Controle, Tratamento 2 = Adição de OTC, Tratamento 3 = Adição de IMZ, Tratamento 4 = Adição de mistura de OTC e IMZ.....51
- Tabela 2.10 – Índice de diversidade de Shannon-Wiener para o Domínio Bacteria para amostras dos bioensaios de decomposição aeróbia e anaeróbia. Tratamento 1 = Controle, Tratamento 2 = Adição de OTC, Tratamento 3 = Adição de IMZ, Tratamento 4 = Adição de mistura de OTC e IMZ.....52
- Tabela 3.1 – Parâmetros para os decaimentos da OTC ao longo do tempo para as condições aeróbia e anaeróbia. Em que:  $k$  = coeficiente de decaimento,  $r^2$  = coeficiente de ajuste do modelo,  $t_{1/2}$  = tempo de meia-vida. Tratamento 5 = Adição de OTC, Tratamento 6 = Adição de mistura de OTC e IMZ.....74

## Lista de Abreviaturas e Siglas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico - <i>Deoxyribonucleic Acid (DNA)</i>
AN	Ágar Nutriente
ANOVA	<i>Analyses of Variance</i> - Análise de Variância
ARN	Ácido Ribonucleico - <i>Ribonucleic Acid (RNA)</i>
AS	Ágar Sabouraud
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CCI	Coefficiente de Correlação Interclasse
CE	Condutividade Elétrica
CI	Carbono Inorgânico
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CM	Carbono Mineralizado
CO	Carbono Orgânico
COD	Carbono Orgânico Dissolvido
COP	Carbono Orgânico Particulado
COT	Carbono Orgânico Total
CPS	<i>Casein-Peptone-Starch</i> – Caseína-Peptona-Amido
DAD	Detecção por Arranjo de Diodos
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i> - 4',6-diamidino-2-fenilindol
DBO	Demanda Bioquímica por Oxigênio
DGGE	<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i> – Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante
DRBC	Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i> – Ácido etilenodiamino tetra-acético
EFS	Extração em Fase Sólida
ETA	Estação de Tratamento de Água
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
IMZ	Imazalil
k	Coefficiente de mineralização
kGy	Kilogray
Koc	Coefficiente de Adsorção ao Carbono Orgânico
LS	Lábil/solúvel
MO	Matéria Orgânica
MOD	Matéria Orgânica Dissolvida
MOP	Matéria Orgânica Particulada
NT	Nitrogênio Total
OD	Oxigênio Dissolvido
OTC	Oxitetraciclina
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – Reação de Polimerase em Cadeia
pKa	Constante de Dissociação Ácida
PT	Fósforo Total
R	Refrarário
rARN	ARN ribossomal
TAE	TRIS:Acetato:EDTA
t <sub>½</sub>	Tempo de Meia-vida
TRIS	<i>Dimethylaminomethyl</i>
UC	Unidade de Conservação
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UNT	Unidade Nefelométrica de Turbidez
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method using Arithmetic mean</i>

## **Apresentação da Tese**

Esta tese está apresentada em quatro partes, que foram nomeadas como: I - Contextualização da Pesquisa, Justificativa, Objetivo Geral e Hipótese; II - Decomposição de *Egeria najas* Planch; III - Decaimento de Oxitetraciclina na Presença e na Ausência de Detritos de *Egeria najas* Planch; IV - Discussão Geral, Conclusões e Perspectivas.

Na primeira parte, há uma breve revisão sobre a contextualização em que está inserida esta pesquisa. Procurou-se destacar os aspectos relacionados à contaminação ambiental por resíduos farmacêuticos, especialmente os antimicrobianos, apontando a origem do problema e consequências associadas a esse tipo de contaminação. Com isso, foi justificado o estudo dos antimicrobianos como possíveis agentes perturbadores e que podem afetar funções microbianas importantes para a manutenção do funcionamento dos ecossistemas aquáticos.

As segunda e terceira partes trazem o objeto da pesquisa, dividido em duas frentes. Na segunda parte, são descritos os bioensaios relacionados à decomposição da macrófita aquática *E. najas* sob a influência de antimicrobianos (oxitetraciclina e imazalil), sendo este o principal foco da pesquisa. Na terceira parte, são descritos e experimentos adicionais ao objetivo principal. Estes descrevem o destino e comportamento de um dos antimicrobianos utilizados nos experimentos com *E. najas*, a oxitetraciclina, em bioensaios de decomposição.

A última parte, apresenta uma discussão geral sobre os resultados obtidos nos experimentos, conclusões e perspectivas para outros trabalhos a partir das experiências obtidas.

Esta pesquisa integra o financiamento pela FAPESP (Processo nº. 2013/02989-0) do projeto denominado *Influência dos antibióticos oxitetraciclina e imazalil na*

*diversidade e funções ecológicas microbianas em ambiente aquático*, sob a coordenação da Profa. Dra. Mirna Helena Regali Selegim, do laboratório de Ecologia de Microrganismos Aquáticos (DEBE/ UFSCar). As colaboradoras vinculadas ao projeto são a Profa. Dra. Marcela Bianchessi da Cunha Santino, pesquisadora do Laboratório de Bioensaios e Modelagem Matemática (DHB/ UFSCar), Profa. Dra. Eny Maria Vieira, pesquisadora do Laboratório de Química Analítica, Ambiental e Ecotoxicologia (Departamento de Química e Física Molecular/ EESC/ USP) e a Profa. Dra. Maria Bernadete A. Varesche Silva, pesquisadora do Laboratório de Processos Biológicos (SHS/ EESC/ USP).

## Sumário

### Parte I – Contextualização da Pesquisa, Justificativa, Objetivo Geral e Hipótese

1 Contextualização da pesquisa.....	2
1.1 Fármacos residuais em matrizes ambientais.....	2
1.2 Resíduos de antimicrobianos no ambiente.....	6
2 Justificativa.....	10
3 Objetivo Geral.....	10
4 Hipótese.....	10

### Parte II – Decomposição de *Egeria najas* Planch

1 Introdução.....	12
1.1 Papel da comunidade microbiana heterotrófica no fluxo de energia e ciclagem de nutrientes nos ecossistemas aquáticos.....	12
1.2 Matéria orgânica, formação de detritos e ciclo do carbono nos ambientes aquáticos.....	14
1.3 Macrófitas aquáticas: fontes de detritos orgânicos e modelo para estudo de decomposição em ambientes aquáticos.....	16
2 Objetivos.....	18
3 Materiais e métodos .....	19
3.1 Área de Coleta.....	19
3.2 Macrófita escolhida para o estudo: <i>Egeria najas</i> Planch.....	21
3.3 Antimicrobianos escolhidos para o estudo.....	22
3.3.1 Oxitetraciclina.....	22
3.3.2 Imazalil.....	23
3.4 Decomposição de <i>Egeria najas</i> Planch.....	24
3.4.1 Sensibilidade da comunidade microbiana heterotrófica da água da Represa do Beija-Flor e determinação das concentrações de oxitetraciclina e imazalil experimentais.....	25
3.4.2 Bioensaios de decomposição de <i>Egeria najas</i> Planch.....	27
3.4.2.1 Coleta e tratamento das amostras de <i>Egeria najas</i> Planch e água.....	27
3.4.2.2 Delineamento experimental.....	28

3.4.3 Diversidade do Domínio Bacteria por análises de PCR e DGGE.....	32
3.4.3.1 Obtenção de biomassa.....	32
3.4.3.2 Extração de ADN.....	33
3.4.3.3 PCR e DGGE.....	34
3.4.4 Densidade bacteriana.....	36
4 Resultados e discussão.....	37
4.1 Sensibilidade da comunidade microbiana heterotrófica da água da Represa do Beija-Flor e determinação das concentrações de oxitetraciclina e imazalil experimentais.....	37
4.2 Decomposição de <i>Egeria najas</i> Planch.....	39
4.2.1 Variações de pH.....	39
4.2.2 Variações de CE.....	41
4.2.3 Variações de NT.....	43
4.2.4 Balanço de carbono.....	45
4.3 Diversidade do Domínio Bacteria por análises de PCR/DGGE e densidade bacteriana.....	50

**Parte III - Decaimento de Oxitetraciclina na Presença e na Ausência de Detritos de *Egeria najas* Planch**

1 Introdução.....	58
2 Objetivos.....	60
3 Materiais e métodos.....	61
3.1 Padrões e reagentes.....	61
3.2 Método de análise e extração de OTC em água.....	61
3.2.1 Análises em CLAE-DAD.....	61
3.2.2 Preparo das amostras e extração de OTC em água.....	62
3.3 Delineamento experimental: decaimento de oxitetraciclina na presença e ausência de detritos de macrófita <i>Egeria najas</i> Planch.....	64
4 Resultados e discussão.....	66
4.1 Método EFS-CLAE-DAD.....	66
4.2 Decaimento de OTC.....	69
4.2.1 Variações de pH e CE.....	69

4.2.2 Variações de COD.....	71
4.2.3 Variações de OTC.....	72
<b>Parte IV – Discussão Geral, Conclusões e Perspectivas</b>	
1 Discussão geral.....	77
2 Conclusões.....	84
3 Perspectivas.....	84
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>86</b>



## **Parte I**

---

### **Contextualização da Pesquisa, Justificativa, Objetivo Geral e Hipótese**

## **1 Contextualização da pesquisa**

### **1.1 Fármacos residuais em matrizes ambientais**

Os compostos farmacêuticos e seus metabólitos ativos são considerados um dos mais preocupantes contaminantes ambientais emergentes da atualidade. Na literatura são encontradas diversas revisões sobre esse tema que recebeu especial atenção a partir da década de 90 do século passado (HALLING-SORENSEN et al., 1998; DAUGHTON; TERNES, 1999; TOLLS, 2001; HEBERER, 2002; BOXALL, 2004; SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006; KÜMMERER, 2009a; LARSSON, 2014). Segundo revisão de Jones-Lepp (2009), alguns autores já relatavam a presença de fármacos residuais em matrizes ambientais em anos pretéritos. Como exemplo, em 1983, Watts e colaboradores relataram a presença de eritromicina, tetraciclina e teofilina em amostras de água de rio (JONES-LEPP, 2009). No entanto, o maior interesse sobre a existência e possíveis efeitos de fármacos residuais e seus metabólitos no meio ambiente foi intensificado anos depois. Esse interesse foi simultâneo ao avanço nas técnicas analíticas de detecção e quantificação dos compostos, em diversas matrizes ambientais, mesmo em baixíssimas concentrações (HALLING-SORENSEN et al., 1998).

Os fármacos são genericamente definidos como compostos químicos utilizados no tratamento e prevenção de enfermidades. Além dos medicamentos, esses compostos podem ser encontrados em produtos de higiene pessoal como fragrâncias, desinfetantes e antissépticos, protetores solares, shampoos, preservativos, etc. Pouco se sabe sobre os efeitos de seus resíduos sobre a saúde humana ou de outros organismos. No entanto, acredita-se na potencialidade de efeitos adversos visto a persistência no ambiente de alguns desses compostos e a exposição crônica pela introdução contínua no ambiente (SAWYER; MCCARTY; PARKIN, 2003). Os efeitos sobre os organismos podem não ser observados quando estes são expostos a baixas concentrações, mas os efeitos da exposição cumulativa talvez possam ser notados apenas quando as alterações forem irreversíveis (DAUGHTON; TERNES, 1999; BOUND; VOULVOULIS, 2004).

Após serem administrados para fins terapêuticos, as moléculas dos medicamentos são absorvidas, distribuídas, parcialmente metabolizadas e por fim excretadas pelo organismo. O organismo também elimina o excesso de moléculas da droga administrada na sua forma parental. A maior finalidade do metabolismo de um composto farmacêutico é facilitar sua remoção do organismo, prevenindo o acúmulo de compostos estranhos ou

potencialmente tóxicos a ele. Em geral, o metabolismo dessas substâncias pode gerar produtos inativos biologicamente, metabólitos ativos semelhantes aos composto parental, metabólitos tóxicos ou ainda metabólitos ativos com ação fisiológica diferente do esperado para o composto parental (KING, 2009).

Os processos enzimáticos de metabolização *in vivo* passam pelas fases I e II (WILLIANS, 1947) que podem ocorrer simultaneamente ou em sequência sem que haja uma ordem exclusiva para isso. Na fase I, há oxidação, redução e hidrólise tornando a molécula final mais polar pela “exposição” ou adição de grupos funcionais como hidroxil (-OH), amino (-NH-) e ácido carboxílico (-COOH). Na fase II, ocorrem as reações de conjugação ligando um novo grupo funcional tanto na molécula parental quanto nas moléculas resultantes das reações da fase I, aumentando ainda mais a polaridade da molécula (KING, 2009). As modificações enzimáticas modulam a biodisponibilidade da molécula e a tornam mais hidrofílica, contribuindo assim, para o processo de excreção (CELIZ; TSO; AGA, 2009).

Desta forma, importantes fontes desses compostos para o ambiente são justamente as redes de esgoto e os efluentes das estações de tratamento de esgoto (ETEs). Os tratamentos convencionais de esgoto e efluentes não são capazes de eliminar todos os resíduos de compostos farmacêuticos aportados nas ETEs. Assim, tratamentos mais avançados são necessários para que seja alcançada a retenção/degradação satisfatória desses compostos, antes da eliminação dos efluentes das ETEs nos corpos de água. Diversos tratamentos são propostos para esse fim, como o uso de lodo ativado, biorreatores com membrana, processos oxidativos avançados, adsorção em carvão ativado, entre outros (GÖBEL et al., 2007; ZHAO et al., 2015).

Além destas, outras fontes importantes de contaminação do ambiente por compostos farmacêuticos podem ser citadas. Entre elas estão os efluentes das indústrias farmacêuticas, o uso direto de medicamentos aplicados em corpos de água nas atividades de aquicultura e ainda a eliminação desses compostos nas excretas e fezes de animais (HALLING-SORENSEN et al., 1998; DAUGHTON; TERNES, 1999; SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006).

No ambiente, os resíduos de medicamentos oriundos de uso veterinário podem acumular-se no solo por processos de adsorção, ou ainda passar pelos processos de transporte, como lixiviação e escoamento superficial, chegando aos corpos d’água receptores (TOPP et al., 2008). Simultaneamente aos processos de transporte, os fármacos residuais podem sofrer diversas transformações importantes no ambiente, assim como

ocorre na metabolização *in vivo*. Essas transformações compreendem tanto reações abióticas quanto reações bióticas, mediadas pelo aparato enzimático de microrganismos. As reações previstas são as transformações fotoquímicas, hidrólise com substituição de núcleos lipofílicos, dehidrohalogenação e oxido-redução. Todas essas transformações na estrutura molecular irão definir as propriedades e destino dessas moléculas no ambiente, bem como a toxicidade aos diversos organismos que possam entrar em contato com elas (SAWYER; MCCARTY; PARKIN, 2003).

De forma esquemática, as rotas dos resíduos de compostos farmacêuticos podem ser expressas de acordo com a Figura 1.1. O esquema apresentado nesta figura, modificada de Halling-Sorensen et al. (1998), evidencia a possibilidade de efeitos causados aos organismos não-alvo e mostram que, independente da via de entrada, o receptor final é sempre um corpo de água. Hirsch et al. (1999) apresentam um esquema semelhante ao proposto anteriormente (Figura 1.2). No entanto, adicionam a indústria farmacêutica como fonte de contaminação do ambiente com os resíduos de sua produção. A Figura 1.2 também evidencia as possibilidades de efeitos adversos aos seres humanos devido a contaminação final da água potável, visto a grande dificuldade de remoção desses compostos também nas estações de tratamento de água (ETAs).

O aporte de resíduos de medicamentos no ambiente é maior conforme crescem a produção e consumo de compostos farmacêuticos (BARRON et al., 2013). A produção mundial de produtos farmacêuticos cresceu nos últimos anos e tende a estar cada vez mais atuante com as inovações nas tecnologias, redução de custo de produção e melhoramento dos medicamentos produzidos. Associados a esses fatores, estão o aumento da demanda e acesso a medicamentos pela crescente população mundial (IFPMA, 2011) e ainda o aumento do uso de medicamentos em atividades relacionadas à agricultura e produção animal para consumo humano.

De acordo com Paula (2001), a indústria farmacêutica representava naquela época cerca de 33% da produção anual de químicos no mundo. Em um panorama mais atual, segundo estudo do Institute for Healthcare Informatics (IMS, 2012), o gasto anual da produção mundial de medicamentos crescerá cerca 1,2 trilhão de dólares até 2016, em relação ao esperado entre os anos de 2012 e 2016. Os dez maiores mercados de produtos farmacêuticos no mundo são Estados Unidos, Japão, China, Alemanha, França, Itália, Espanha, Brasil, Canadá e Reino Unido.

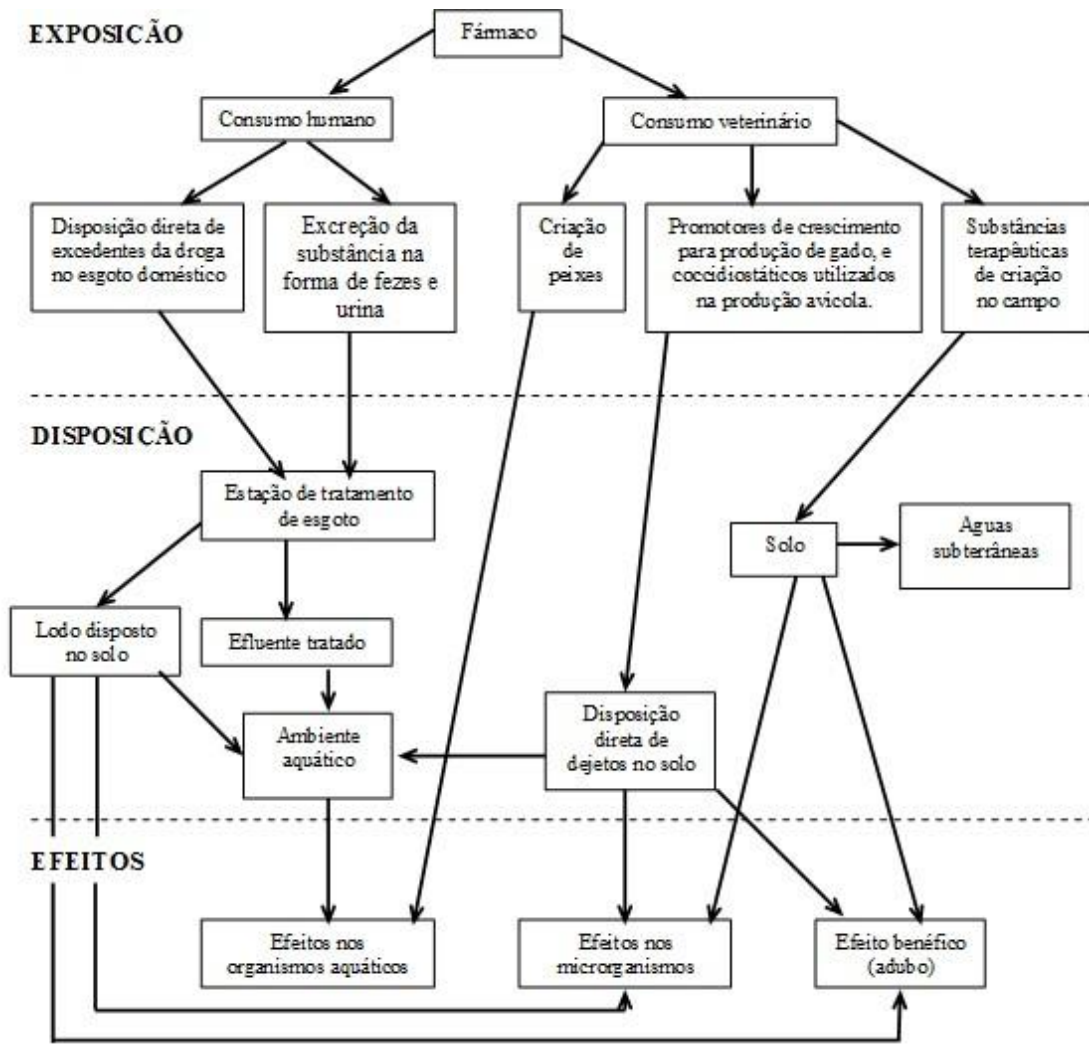


Figura 1.1 – Rotas de exposição de fármacos no ambiente. Modificado de Halling-Sorensen et al. (1998).

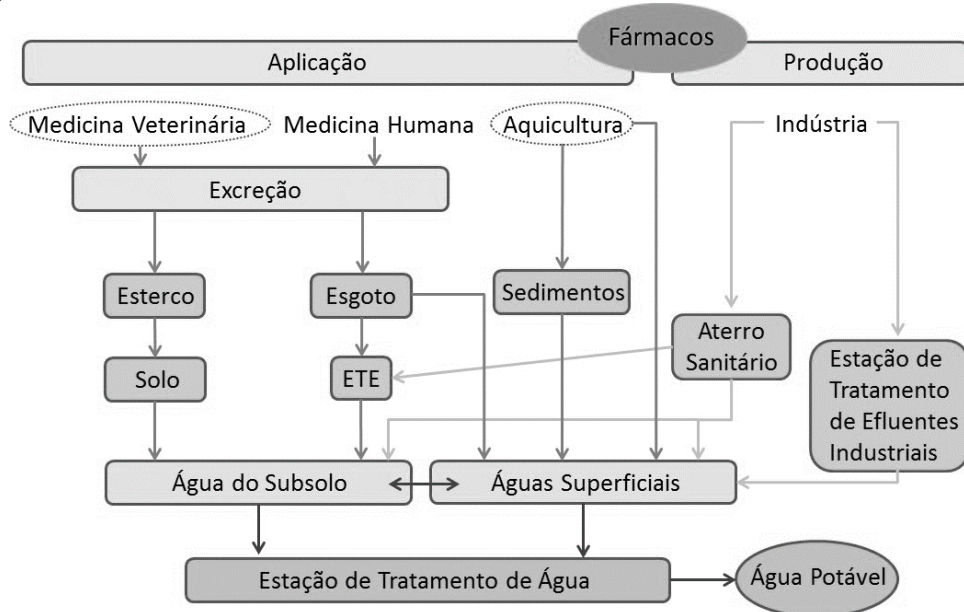


Figura 1.2 – Fontes e distribuição de fármacos no ambiente. Modificado de Hirsch et al. (1999).

O Brasil é um país emergente no mercado farmacêutico tendo sido projetado para chegar ao quarto lugar no ranking dos gastos com produção farmacêutica no mundo, em 2016 (IMS, 2012). Associada a esta projeção e ao maior acesso a medicamentos pela população, a contaminação ambiental por resíduos farmacêuticos é agravada devido as falhas relacionadas ao saneamento básico e ao tratamento de esgoto no país. Segundo o IBGE (2008) apenas 55,2% dos municípios brasileiros possuem redes coletoras de esgoto, e deste total apenas 28,5% dos municípios fazem seu tratamento.

Outro fator importante para que a contaminação ambiental por resíduos farmacêuticos seja importante no Brasil, é expressividade da produção animal como atividade do agronegócio brasileiro. Segundo revisão de Regitano e Leal (2010), o país é um dos principais líderes mundiais na produção de alimentos de origem animal, dentre carne bovina, suína, peixes e crustáceos. Proporcional ao volume de produção está a utilização de medicamentos com fins terapêuticos e de profilaxia (THIELE-BRUHN, 2003).

Seguindo esta mesma lógica, uma outra importante fonte de contaminação de compostos farmacêuticos no ambiente é a produção agrícola. O Brasil é líder na produtividade agrícola na América Latina e Caribe e apresenta índices de crescimento acima da média mundial, de acordo com estudo da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) de 2011 (BRASIL, 2012). O crescimento anual da produtividade agrícola do Brasil é de 3,6% ao ano, comparativamente aos 2,6% da América Latina, 0,86% dos países desenvolvidos e 1,98% para o conjunto de países em desenvolvimento. Além disso, o Brasil é líder mundial na exportação de diversos produtos agrícolas como laranja, açúcar, café, tabaco e soja (PEROBELLI et al., 2007).

## **1.2 Resíduos de antimicrobianos no ambiente**

Dentre os medicamentos residuais encontrados no ambiente, a classe dos compostos antimicrobianos tem causado grande preocupação, devido aos potenciais efeitos negativos em microrganismos. Os antimicrobianos são substâncias utilizadas na prevenção e tratamento de doenças infecciosas sendo capazes de interferir no crescimento de bactérias e fungos. Alguns autores também classificam como antimicrobianos os agentes capazes de afetar vírus e protozoários (KÜMMERER, 2009a). Os antimicrobianos podem ter ação letal sobre os microrganismos, sendo chamados de

bactericidas/fungicidas, ou ação inibidora do crescimento, sendo então chamados de bacteriostáticos/fungistáticos (MADIGAN et al., 2009).

Os antibióticos são produzidos naturalmente por bactérias e fungos, em condições ambientais específicas e em geral para regulação de crescimento populacional de microrganismos competidores. Desta forma, são compreendidos como metabólitos secundários de alguns microrganismos e se caracterizam pela grande diversidade de estrutura química e especificidade quanto ao organismo produtor e organismos-alvo (KURYLOWICZ, 1981). A grande maioria dos antibióticos conhecidos e naturalmente produzidos são elaborados por actinomicetos. Além dos antibióticos naturais, existem ainda os produtos antimicrobianos semissintéticos, desenvolvidos a partir de modificações dos antibióticos naturais, e os sintéticos produzidos pelo homem especificamente para uso quimioterápico (WALSH, 2003).

Os agentes antimicrobianos de uso clínico, veterinário e agrícola possuem uma característica muito importante que é a especificidade de sua ação, o que garante pouco efeito adverso às células do organismo hospedeiro. Essa característica, chamada de toxicidade seletiva, faz com que o agente antimicrobiano quimioterápico afete um grupo limitado e específico de microrganismos, sendo classificados quanto ao seu espectro de ação. Assim, em geral, antimicrobianos específicos de células eucarióticas atacam fungos ou protozoários. Antimicrobianos específicos para células bacterianas podem afetar separadamente células Gram-positivas, Gram-negativas e micobactérias, ou podem ser de amplo espectro abrangendo todo o tipo de células bacteriana. Por fim, os agentes específicos contra vírus podem atacar os vírus ADN (ácido desoxirribonucleico) e/ou os vírus ARN (ácido ribonucleico) (MADIGAN et al., 2009).

Os mecanismos de ação dos antimicrobianos são diversos. Os antimicrobianos em uso clínico podem afetar as células bacterianas por ação direta na inibição da síntese da parede celular, inibição da síntese protéica e lipídica, inibição da replicação e reparo de ADN, alteração da estrutura e função da membrana citoplasmática e alteração no metabolismo do ácido fólico (WALSH, 2003). Nas células fúngicas, as ações dos principais antimicrobianos em uso são a alteração da estrutura e função da membrana citoplasmática e inibição da síntese e reparo do ADN (BERGOLD; GEORGIADS, 2004).

Após administrados, os antibióticos passam pelo mesmo processo de metabolização e excreção citados no item 1.1. Estima-se que de 25 a 75% da dosagem consumida de um antimicrobiano seja excretada de forma inalterada (BORGHI; PALMA, 2014). A vasta aplicação de antimicrobianos no tratamento e prevenção de doenças

infeciosas na medicina humana, veterinária e na agricultura faz com que a detecção destes compostos no ambiente seja cada vez mais frequente (HIRSCH et al., 1999; SACHER et al., 2001; KOLPIN et al., 2002; ZUCCATO et al., 2010; LEAL et al., 2012; TANG et al., 2015). Revisões sobre essa temática foram realizadas principalmente por Kümmerer (2004), Kümmerer (2009a) e Kümmerer (2009b).

Uma das maiores preocupações quanto a presença de antimicrobianos residuais no ambiente está relacionada com o aparecimento de microrganismos patogênicos resistentes e que podem afetar tanto a saúde humana quanto a animal (KÜMMERER, 2004). Embora sejam mais comuns trabalhos que relatam a resistência de bactérias a antimicrobianos, os fungos, protozoários e vírus também são capazes de desenvolverem esse tipo de defesa. A resistência a antibióticos é um fenômeno natural, conservado evolutivamente, e estabelecido como um meio de sobrevivência dos microrganismos em ambientes adversos (KÜMMERER, 2009b). O conhecimento sobre o mecanismo de resistência a antimicrobianos já é antigo, mas o número de organismos resistentes, as localizações geográficas afetadas pela resistência aos medicamentos, e a potência de resistência em organismos individuais são recentes e sem precedentes (LEVY; MARSHALL, 2004).

A resistência aos antimicrobianos pode ser intrínseca do microrganismo ou adquirida. A resistência intrínseca faz parte da herança genética do microrganismo sendo transmitida verticalmente de geração em geração, e é principalmente caracterizada pela presença ou ausência do alvo para ação do antimicrobiano. Por ser previsível, esse tipo de resistência é contornável com a aplicação clínica de antimicrobianos adequados para cada tipo de microrganismo a ser combatido. A resistência adquirida pode ocorrer por transmissão horizontal de material genético de outros microrganismos ou por mutação espontânea, sendo imprevisível e inesperada. As alterações genéticas responsáveis pela resistência microbiana mantêm a viabilidade celular e podem aumentar a patogenicidade do microrganismo (DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2008).

Além das preocupações relacionadas com a patogenicidade de microrganismos resistentes, desenvolvidos pelo constante contato com antimicrobianos lançados no ambiente, há que se ressaltar outros possíveis efeitos de ordem ambiental causados por esse tipo de contaminação. A contaminação do ambiente por antimicrobianos pode alterar as comunidades microbianas que desempenham papel crucial nos processos metabólicos dos ecossistemas, como regeneração de nutriente, mineralização da matéria orgânica,



degradação de poluentes, etc (COSTANZO; MURBY; BATES, 2005). Essa abordagem ainda é pouco explorada e a dimensão deste problema não é bem conhecida.

Westergaard et al. (2001) avaliaram os efeitos da tilosina, um antibiótico muito utilizado na produção animal como promotor de crescimento, sobre a comunidade microbiana do solo. Os autores observaram alterações na estrutura da comunidade bacteriana, bem como na ação indireta desse composto aos organismos não alvo como fungos e protozoários. Thiele-Bruhn e Beck (2005), em estudo sobre o mesmo tema, avaliaram as alterações da comunidade microbiana edáfica sob influência dos antibióticos sulfapiridina e oxitetraciclina e também concluíram que os resíduos dessas substâncias podem exercer pressão seletiva sobre a comunidade microbiana natural.

A comunidade microbiana associada à decomposição de detritos vegetais em rios foi avaliada sob efeito do antimicrobiano sintético ciprofloxacina por Maul et al. (2006). Os autores concluíram que a ação efetiva do antibiótico sobre as bactérias nas condições experimentais ocorreu em concentrações maiores do que as concentrações do antibiótico encontradas no ambiente. No entanto, evidenciaram a importância desse resultado e a necessidade de diversos níveis tróficos serem avaliados nesse tipo de estudo. Näslund, Hedman e Agestrand (2008) avaliaram a influência dessa mesma substância na comunidade microbiana associada à degradação do pireno, um importante poluente orgânico em sedimentos marinhos. Os resultados obtidos mostraram alteração nas taxas de mineralização do composto, como consequência das mudanças na comunidade microbiana sob efeito da ciprofloxacina. Os efeitos da ciprofloxacina, em estudos com mesocosmos no ambiente, também foram avaliados por Weber et al. (2011). Os autores relatam a perda de diversidade microbiana sob efeito do antibiótico e a queda temporária na capacidade catabólica global da comunidade microbiana.

Os possíveis efeitos dos antimicrobianos residuais tanto para saúde humana, através do desenvolvimento de bactérias patogênicas resistentes, quanto na estrutura e função das comunidades microbianas naturais são muito maiores e mais frequentes devido ao uso extensivo e indiscriminado desses compostos. De acordo com estudo publicado em 2014 por Van Boeckel et al. (2014), o consumo humano de antibiótico ao redor do mundo cresceu 36% no período compreendido entre os anos 2000 a 2010. Dentro deste panorama, os maiores responsáveis pelo aumento no consumo desse tipo de medicamento foram o Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul respondendo por 76% do crescimento total de consumo mundial no mesmo período. O crescimento econômico

e os maiores gastos na área da saúde observados nesses países são apontados como os principais fatores para essa participação expressiva no consumo de antibióticos mundial.

Embora não estejam disponíveis dados com o mesmo enfoque para uso de antibióticos na medicina veterinária, produção animal e agricultura, sabe-se que o uso dessas substâncias também é extenso nesses setores. Cada país possui sua própria legislação e relevância mundial em uma determinada área produtiva o que faz com que o uso dessas substâncias para esses fins seja heterogêneo. No entanto, estima-se que o consumo de antimicrobianos na medicina veterinária e agricultura gire em torno de 50% do total de consumo dessas substâncias em países da Europa e nos Estados Unidos (KÜMMERER, 2009a).

## **2 Justificativa**

Considerando a temática apresentada e as implicações associadas a ocorrência de antimicrobianos residuais em matrizes ambientais, são necessários cada vez mais trabalhos que enfoquem os efeitos desses resíduos no ambiente com uma abordagem sistêmica e ecológica sobre o problema. A contaminação do ambiente aquático por compostos antimicrobianos pode alterar o equilíbrio e atividades microbianas relacionadas aos processos de decomposição da matéria orgânica e assim, alterar as taxas de ciclagem de nutrientes e carbono no ambiente.

## **3 Objetivo geral**

O objetivo geral desta pesquisa foi avaliar a influência dos compostos OTC e IMZ sobre o processo de decomposição aeróbia e anaeróbia de detritos da macrófita aquática *Egeria najas* Planch.

## **4 Hipótese**

Assumindo que a decomposição de detritos vegetais no ambiente aquático é mediada pela ação de microrganismos decompositores, a hipótese considerada nesse estudo admitiu que a decomposição de *E. najas* é mais lenta na presença de compostos antimicrobianos OTC e IMZ, tanto em condição aeróbia quanto na condição anaeróbia.

## Parte II

---

### Decomposição de *Egeria najas* Planch

## **1 Introdução**

### **1.1 Papel da comunidade microbiana heterotrófica no fluxo de energia e ciclagem de nutrientes e carbono nos ecossistemas aquáticos**

Os microrganismos estão relacionados com a manutenção do funcionamento dos ecossistemas, sendo os principais responsáveis pelo fluxo de energia e ciclagem de nutrientes e de carbono das teias alimentares (FUHRMAN, 2009). Os microrganismos autotróficos utilizam carbono e energia para o crescimento provenientes de fontes não orgânicas. Assim, fixam o carbono gasoso em sua forma inorgânica (CO<sub>2</sub>) e o transformam, utilizando a energia solar, em biomassa através dos processos fotossintéticos. Os microrganismos heterotróficos garantem a energia para o seu crescimento através das fontes de carbono da matéria orgânica previamente formadas pelos processos autotróficos ( RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001; RICKEFS, 2003).

A comunidade microbiana heterotrófica é responsável pela decomposição da matéria orgânica e reintrodução dos nutrientes e de carbono imobilizados nos detritos orgânicos para os ecossistemas naturais. A decomposição por decorrência da ação de microrganismos é reconhecida há anos, com as observações sobre a deterioração de alimentos, e teve repercussão ainda no século XIX com os estudos de Pasteur que derrubaram a teoria da geração espontânea aceita na época (MADIGAN et al., 2009). No entanto, o foco ecológico do papel dos microrganismos na decomposição e na ciclagem de nutrientes e de carbono foi mais presente nos estudos e publicações científicas a partir do século XX, com o trabalho desenvolvido por Lindeman (1942).

A decomposição microbiana ocorre pela quebra de compostos orgânicos complexos e altamente reduzidos em moléculas mais simples. Esse processo ocorre por intermédio de liberação de enzimas degradativas oriundas das reações catabólicas do metabolismo microbiano. As enzimas são responsáveis por hidrolisar as macromoléculas orgânicas em monômeros e outros compostos, atuando como catalisadores das reações de decomposição por redução da energia de ativação na reação global (MADIGAN et al., 2009). A ação das enzimas extracelulares apresenta alta especificidade de reação em relação ao substrato e sua atividade garante o fluxo de componentes assimiláveis por outros organismos heterotróficos (CUNHA-SANTINO; SCIESSERE; BIANCHINI JÚNIOR, 2008).

A decomposição da matéria orgânica é, portanto, um processo de oxidação, sendo os produtos das atividades enzimáticas utilizados na presença de oxigênio livre (O<sub>2</sub>) por microrganismos aeróbios, ou na sua ausência por microrganismos facultativos e anaeróbios. Na presença de oxigênio, o receptor final de elétrons das reações de respiração microbiana é o oxigênio molecular. No entanto, na ausência deste, receptores de elétrons alternativos podem ser utilizados. De acordo com Stumm e Morgan (1996), existe uma sequência preferencial de processo de oxi-redução, do mais eletropositivo ao mais eletronegativo, que na ausência do oxigênio reduz o nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ N<sub>2</sub>), seguido pelo manganês (IV) (MnO<sub>2</sub>/ Mn<sup>+2</sup>), ferro (III) (Fe(OH)<sub>3</sub>/ Fe<sup>+2</sup>), sulfato (SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>/ HS<sup>-</sup>) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>/ CH<sub>4</sub>).

No ambiente aquático, as bases das teias alimentares são grandemente representadas pelos organismos autotróficos que iniciam as cadeias de herbivoria e garantem, após a morte, recursos para as cadeias de detritivoria (BEGON; TOWNSEND; HARPER, 2006). No entanto, os microrganismos heterotróficos, a partir das teias microbianas podem dividir as bases das teias alimentares com os produtores primários (FLYNN, 1988). Assume-se que parte da comunidade microbiana heterotrófica aquática seja responsável pela imobilização, através das reações anabólicas, do carbono orgânico dissolvido e que seria perdido sem entrar na cadeia trófica, caso não houvessem mecanismos de sua utilização pelos microrganismos (WETZEL, 1995).

O conceito descrito anteriormente foi primeiramente sistematizado por Azam et al. (1983) para ambientes marinhos e recebeu o nome de alça microbiana, ou *microbial loop* em inglês, em referência ao retorno do carbono e energia para cadeia trófica por um caminho diferente, sem passar pelo consumo dos produtores primários pelos herbívoros. Hoje, esse conceito já foi ampliado e é solidamente aceito e aplicado também a ambientes aquáticos continentais e solos.

De forma simplificada, o *microbial loop* definia a comunidade bacteriana heterotrófica como responsável pela imobilização do carbono orgânico dissolvido de origem fitoplanctônica, por processos naturais de exudação, e reintrodução desse carbono no ecossistema do pastoreio do bacterioplâncton pelos protozoários, os seus principais predadores (AZAM et al., 1983). Em adição ao que foi inicialmente preconizado por Azam, entende-se que o conceito do *microbial loop* e teia microbiana estão intimamente ligados e não podem considerar apenas a comunidade microbiana e seus predadores diretos como protagonistas do processo (SHERR; SHERR, 1988).

Sob essa ótica, por uma questão de eficiência energética ao longo da cadeia trófica, o *microbial loop* não só atua na ciclagem de carbono, sendo utilizado na respiração do bacterioplâncton e de seus predadores diretos, como também é transferido ao longo da cadeia trófica pela redução de seus elos. Portanto, defende-se que a teia microbiana e o *microbial loop* reúne os microrganismos procariontes e eucariontes autotróficos e heterotróficos, como apresentado na Figura 2.1 (SHERR; SHERR, 1988).

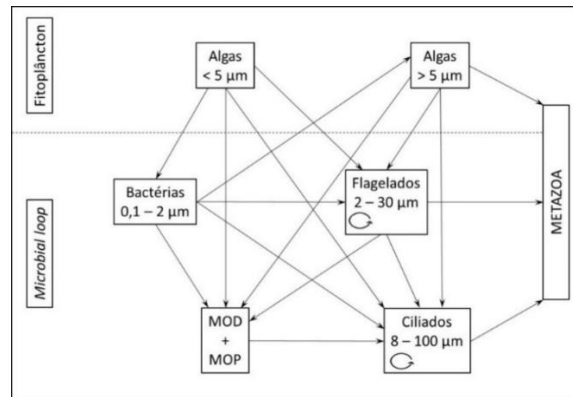


Figura 2.1– Principais elos da teia alimentar microbiana e sua relação com os metazoários. Modificado de Sherr e Sherr (1988).

## 1.2 Matéria orgânica, formação de detritos e ciclo do carbono nos ambientes aquáticos

O aporte de matéria orgânica no ambiente aquático é de extrema importância para a ciclagem de carbono e outros nutrientes como nitrogênio e fósforo. A matéria orgânica no ambiente aquático pode ser de origem alóctone, produzida no ambiente terrestre adjacente e carregada pela bacia de drenagem para o corpo de água. Esta se constitui por material vegetal e animal e representa uma parcela importante de nutrientes e energia aos microrganismos decompositores e consumidores primários. A matéria orgânica alóctone é principalmente relevante em ambientes com baixa produtividade primária e ambientes lóticos de baixa ordem (VANNOTE et al., 1980; SEDELL; RICHEY; SWANSON, 1989).

A matéria orgânica de origem autóctone é constituída, em menor escala, por toda matéria viva produzida no sistema, mas principalmente por detritos oriundos das atividades metabólicas de organismos autótrofos e heterotróficos e da morte e decomposição dos organismos nele inseridos (WETZEL, 2001). A matéria orgânica autóctone é principalmente relevante em ambientes lênticos e remansos de sistemas lóticos de grandes dimensões.

Independente da fonte de matéria orgânica, a fração mais prontamente disponível aos microrganismos aquáticos é a dos detritos. Os detritos orgânicos no ambiente aquático podem ser encontrados nas frações dissolvida e particulada e estão intimamente relacionados ao *pool* de carbono orgânico (CO) a ser consumido ao longo das cadeias alimentares de herbivoria, detritivoria e teias microbianas (WETZEL, 2001).

Sob essa perspectiva, o carbono orgânico dissolvido (COD) é constituído por moléculas oriundas das atividades metabólicas dos organismos que são exudadas e excretadas no ambiente. Além disso, o COD pode ser originado dos processos de lixiviação da fração lábil da porção particulada do CO (COP) nos processos de decomposição. Assim, segundo Esteves (1998), o COD é constituído por compostos nitrogenados, carboidratos solúveis, lipídios, vitaminas e moléculas mais complexas e refratárias, conhecidas como substâncias húmicas.

O CO é a menor fração de carbono existente no ambiente aquático (WETZEL, 2001). A maior parte é encontrada na forma inorgânica (CI) como carbono livre oriundo da difusão do gás  $\text{CO}_2$  da atmosfera na superfície da coluna de água e de processos respiratórios dos organismos. Outras formas encontradas são o ácido carbônico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) e íons bicarbonato e carbonato ( $\text{HCO}_3^-$  e  $\text{CO}_3^{2-}$ ) resultantes das reações de hidratação e dissociações em solução aquosa (WETZEL, 2001). A partir do CI, a produção do CO se dá pela assimilação do carbono livre na coluna de água nos processos fotossintéticos.

De forma simplificada, as vias de transição das frações de CI, COP e COD estão apresentadas na Figura 2.2.

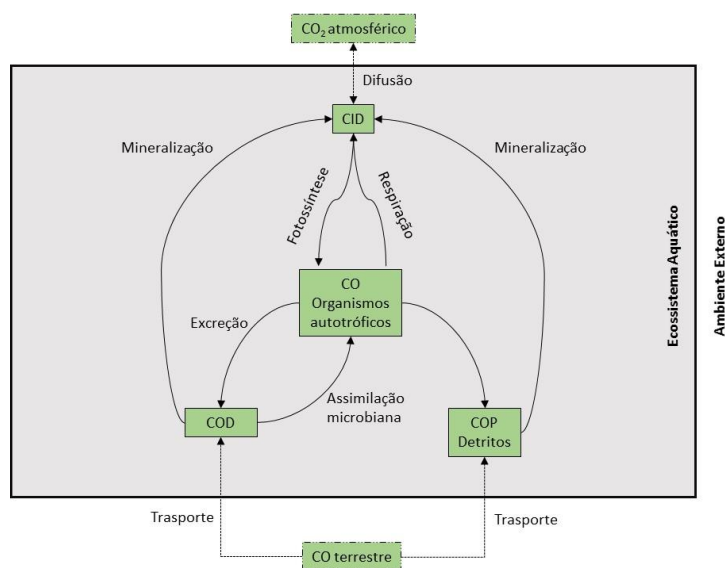


Figura 2.2 – Fluxo entre os estoques de carbono orgânico e inorgânico entre os ecossistemas aquáticos e ambiente externo. CID = carbono inorgânico dissolvido, CO = carbono orgânico, COP = carbono orgânico particulado, COD = carbono orgânico dissolvido,  $\text{CO}_2$  = dióxido de carbono. Modificado de Vidal et al. (2005).

### **1.3 Macrófitas aquáticas: fontes de detritos orgânicos e modelo para estudo de decomposição em ambientes aquáticos**

A designação macrófita aquática é dada aos produtores primários sem que sejam considerados os aspectos taxonômicos para aplicação do termo (ESTEVES, 1998). As macrófitas aquáticas abrangem as macroalgas, briófitas, pteridófitas e espermatófitas cuja as partes fotossinteticamente ativas estão parcial ou totalmente submersas de forma permanente ou sazonal (COOK, 1999). Assim, podem ser consideradas como formas vegetais macroscópicas que possuem adaptações para a vida na água (RASCIO, 2002). No entanto, muitos trabalhos relacionados às macrófitas aquáticas utilizam esse termo para designar plantas superiores vascularizadas pertencentes ao grupo das fanerógamas, que podem viver de forma livre ou fixadas aos substratos, imersas ou parcialmente emersa na superfície (BOSCHKER; DE BROUWER; CARPPENBERG, 1999; NAKAI et al., 1999; BEST et al., 2001; ENGELHARDT; RITCHIE, 2001; LIN et al., 2002; MORRIS et al., 2002; SANTAMARÍA, 2002; BORNETTE; PUIJALON, 2009; VYMAZAL, 2013).

Dentre diversas importâncias dadas às macrófitas aquáticas no equilíbrio do metabolismo dos ecossistemas aquáticos, uma das mais relevantes e diretamente relacionada ao ciclo de carbono é a contribuição destas para formação de detritos orgânicos no ambiente. Como organismos fotossintetizantes, as macrófitas são responsáveis por parte importante da produtividade primária em um corpo de água e garantem uma grande porção de matéria orgânica particulada (MOP) e matéria orgânica dissolvida (MOD) para os processos de assimilação e decomposição do CO na cadeia de detritos (BIANCHINI JÚNIOR; CUNHA-SANTINO, 2008).

Devido as funções ecológicas que desempenham, as macrófitas têm sido amplamente utilizadas nos estudos de mineralização de matéria orgânica e ciclagem de nutrientes no ambiente aquático (BIANCHINI JÚNIOR; CUNHA-SANTINO, 2008; CUNHA-SANTINO; BIANCHINI JÚNIOR, 2009). O estudo da decomposição de detritos de macrófitas contribui para a compreensão dos fatores que regem as taxas de mineralização e como se dá a dinâmica de nutrientes e de carbono no ambiente a partir desse processo. A decomposição de detritos vegetais ocorre em três fases frequentemente simultâneas: (i) lixiviação de componentes hidrossolúveis; (ii) oxidação microbiana de componentes refratários, como celulose e lignina; (iii) fragmentação física e biológica (VALIELA et al., 1985).



A fase de lixiviação é caracterizada pela rápida perda de compostos orgânicos solúveis como carboidratos, ácidos orgânicos, proteínas, compostos fenólicos, entre outros, e minerais como potássio, cálcio, magnésio, manganês, etc. (PARSONS; TAYLOR; PARKINSON, 1990; TAYLOR; BÄRLOCHER, 1996; BIANCHINI JÚNIOR, 1999). As fases de oxidação microbiana e fragmentação são etapas que ocorrem em uma longa escala de tempo, se comparadas com a lixiviação. Estes dois processos atuam diretamente na porção refratária do detrito vegetal, que compreende a maior parte em massa, e dependem das condições intrínsecas do substrato (HARRISON; MANN, 1975).

Além da liberação e incorporação de carbono e nutrientes através da ação enzimática microbiana, a colonização dos detritos vegetais por fungos e bactérias tornam esse recurso mais palatável e energeticamente vantajoso para alimentação de macroinvertebrados. Estes por sua vez, ao se alimentarem dos detritos vegetais, atuam como fragmentadores e aumentam a área de superfície facilitando a ação microbiana sobre os tecidos vegetais refratários e de difícil decomposição (HARRISON; MANN, 1975; HILL; PERROTTE, 1995).

Alguns estudos sobre decomposição de detritos de macrófita incluem comparações cinéticas em diferentes condições de oxidação do meio (BIANCHINI JÚNIOR; PACOBAHYBA; CUNHA-SANTINO, 2002; BITAR; BIANCHINI JÚNIOR, 2002; BIANCHINI JÚNIOR et al., 2014), diferentes condições de nutrientes disponíveis no ambiente e relação destas com a ação microbiana associada ao processo (BATTLE; MIHUC, 2000; DAVIS et al., 2003; REJMÁNKOVÁ; SIROVÁ, 2007; THULLEN et al., 2008; CHEN et al., 2011), entre outros. Pouco foi estudado sobre efeitos de contaminantes lançados no meio por atividades humanas nos processos de decomposição de macrófitas.

A dinâmica do processo de mineralização de detritos vegetais pode servir como um indicador da integridade funcional de um ambiente aquático e a forma como diversos estressores ambientais atuam sobre esse processo sinaliza e direciona as alterações na estabilidade ecossistêmica (GESSNER; CHAUVET, 2002). Assim, fatores que alterem as atividades microbianas sobre a decomposição da matéria orgânica podem alterar as taxas de ciclagem de carbono e de nutrientes, afetando toda cadeia trófica do ambiente.

## 2 Objetivos

Frente às considerações expostas anteriormente, os objetivos deste trabalho foram:

- ✓ Determinar a sensibilidade da comunidade bacteriana heterotrófica da coluna d'água da Represa do Beija-Flor aos compostos OTC e IMZ;
- ✓ Determinar os parâmetros cinéticos, através do balanço de carbono, para a decomposição da macrófita aquática *E. najas*, em bioensaios sob condições aeróbia e anaeróbia;
- ✓ Determinar os parâmetros cinéticos, através do balanço de carbono, para a decomposição da macrófita aquática *E. najas* sob influência de dois compostos antimicrobianos, OTC e IMZ, em bioensaios sob condições aeróbia e anaeróbia;
- ✓ Determinar o perfil da comunidade bacteriana da fração aquosa de bioensaios de decomposição de *E. najas*, sob condições aeróbia e anaeróbia, por análise de eletroforese em gel com gradiente desnaturante;
- ✓ Determinar a densidade de células bacterianas da fração aquosa de bioensaios de decomposição de *E. najas*, sob condições aeróbia e anaeróbia, por contagem em microscópio de epifluorescência.

### 3 Materiais e métodos

#### 3.1 Área de coleta

A coleta de amostras de macrófita e água para a elaboração dos bioensaios foi realizada na Represa do Beija-Flor, situada na Estação Ecológica do Jataí (EEJ) (São Paulo, Brasil).

A EEJ está localizada no nordeste do estado de São Paulo (21°30' e 21°40' S; 47°40' e 47°50' O), no município de Luiz Antônio, em área de domínio da Fazenda Pública do Estado, a aproximadamente 600 m de altitude (SANTOS; PIRES; PIRES, 2000). É uma importante área de conservação com uma das maiores áreas de cerrado *latu sensu* do estado (SÃO PAULO, 1997) (Figura 2.3). Criada em 1982 com 4.532,18 ha e ampliada em 2002 pelo Decreto Lei 47.096-SP/02, a EEJ possui hoje um total de 9.010,7 ha de área e é categorizada como uma unidade de conservação (UC) de proteção integral (FUNDAÇÃO FLORESTAL, 2015).

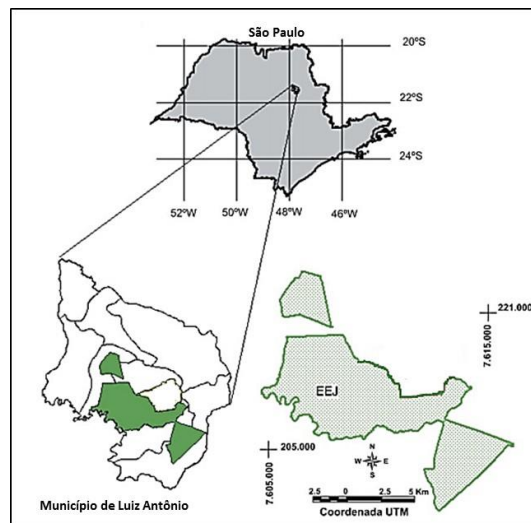


Figura 2.3 – Localização e abrangência atual da Estação Ecológica do Jataí (EEJ) no município de Luiz Antônio, estado de São Paulo. Modificado de Guerreschi (2004).

As terras do entorno desta UC são amplamente ocupadas por atividades agrícolas. De acordo com Tombosi (2008), destacam-se a cultura de cana-de-açúcar e áreas de silvicultura, com espécies exóticas como *Eucalyptus* spp. e *Pinus* spp. Com menor área de cobertura citam-se a citricultura e pequenas manchas esparsas de pastagens.

As condições climáticas da região podem ser classificadas como clima Aw de Köppen (PEREIRA-SILVA et al., 2011). Ocorrem duas estações climáticas definidas, a

seca, entre abril e setembro, e a chuvosa, entre outubro e março (GALVÃO, 1976). De acordo com Cavalheiro et al. (1990), a EEJ encontra-se na província geomorfológica denominada Planalto Ocidental com relevo suave a moderadamente ondulado. As rochas são areníticas e basálticas e os solos constituídos predominantemente por latossolos vermelho escuro e areias quartzosas. Em menor proporção são encontrados os latossolos vermelho amarelo, solos hidromórficos e latossolos roxo (SANTOS; PIRES; PIRES, 2000).

A EEJ é drenada por diversos córregos, dentre os quais destaca-se o córrego do Beija-Flor, ou Jataí, que está integralmente situado dentro dos limites da UC. Este córrego é formado pela união das águas do córrego da Bandeira (divisa nordeste da EEJ) e do córrego Cabaças, desaguando no rio Mogi-Guaçu, no limite sudoeste da EEJ (SANTOS; PIRES; PIRES, 2000).

A represa do Beija-Flor (Figura 2.4) foi formada pelo represamento artificial do córrego do Beija-Flor, em 1965 (RODRIGUES, 1997). Apesar do nome represa, não há qualquer controle de entrada e saída de água do sistema, sendo mantida a comunicação permanente com o córrego Beija-Flor e com o rio Mogi-Guaçu (RODRIGUES, 1997). A área da represa abrange cerca de 17,54 ha com profundidade média de 1,80 m, sendo considerado um ambiente raso (PIRES, 1994).

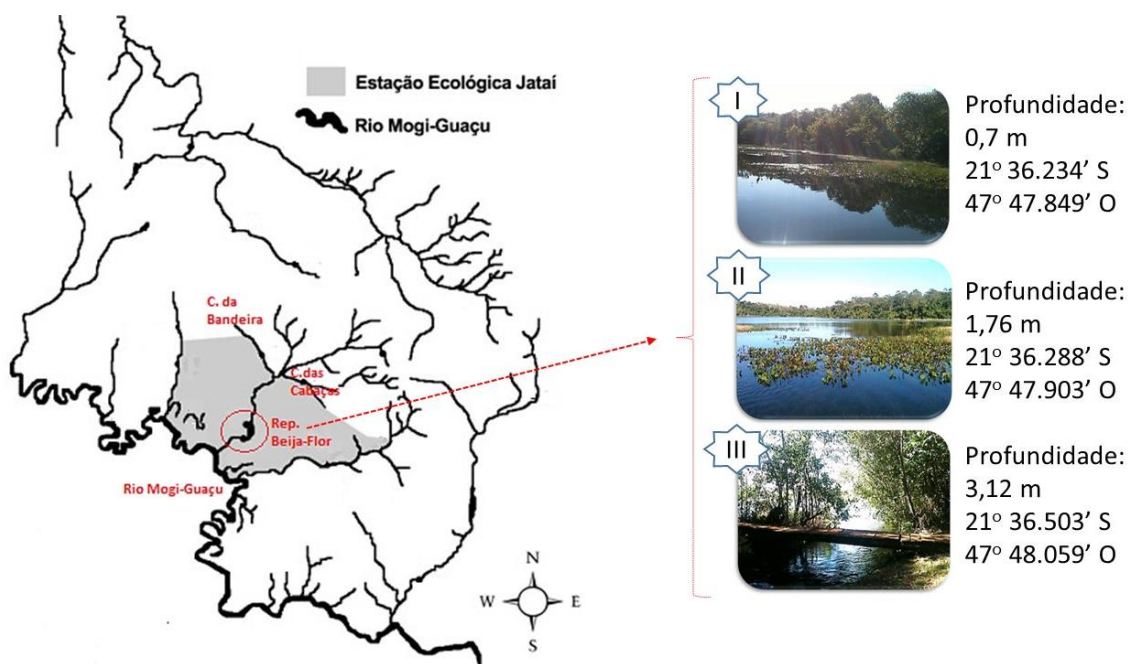


Figura 2.4 – Localização da represa do Beija-Flor na EEJ e pontos de coleta. Modificado de Ferreira-Peruquetti e Fonseca-Gessner (2003). Fotos: Helena Janke.

Segundo Scilessere (2011) e Duó (2015), a Represa do Beija-Flor é um ambiente ácido, com valores de pH próximos a 5,5, e com predomínio de formas orgânicas de carbono dissolvido. As margens da represa possuem vegetação arbórea e arbustiva densa e comunidade de macrófitas aquáticas diversificada, com espécies de plantas emergentes, flutuante e submersas. Entre elas citam-se *Cabomba* sp., *Utricularia* sp. *Pontederia* sp., *Eichhornia azurea*, *Salvinia molesta*, *Eleocharis* sp, *Nymphaea* sp. (SCIESSERE, 2011) e *Egeria najas*.

### 3.2 Macrófita escolhida para o estudo: *Egeria najas* Planch

*Egeria najas* Planch (Angiospermae, Hydrocharitaceae) (Figura 2.5) é uma macrófita aquática submersa fixa, nativa da América do Sul (COOK; URMI-KÖNIG, 1984). Trata-se de uma planta dióica com rara reprodução sexuada, mas que possui alta capacidade de propagação vegetativa (COOK; URMI-KÖNIG, 1984; MORI et al., 1999; CARVALHO et al., 2003). Por ser comercializada e utilizada como planta ornamental no aquarismo e aquapaisagismo, a *E. najas* se disseminou em países como Japão, Estados Unidos, Nova Zelândia e Austrália onde é considerada um problema ambiental como planta invasora (ROBERTS; CHURCH; CUMMINS, 1999; MARTINS et al., 2003).

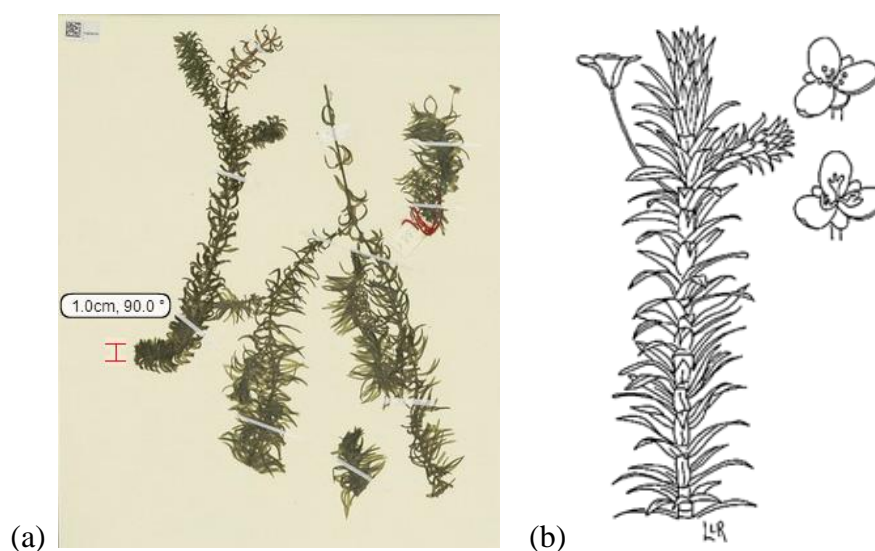


Figura 2.5 – (a) Foto de exemplar de *E. najas*. Extraído de <http://www.herbariovirtualreflora.jbrj.gov.br/jabot/herbarioVirtual/ConsultaPublicoHVUC/ConsultaPublicoHVUC.do?idTestemunho=2256466>. Acesso em: 16 jul. 2015. (b) Esquema de um ramo de *Egeria* sp em fase reprodutiva, em detalhe a flor masculina e feminina. Extraído de [http://idtools.org/id/aquariumplants/Aquarium\\_&\\_Pond\\_Plants\\_of\\_the\\_World/key/Aquarium\\_&\\_Pond\\_Plants/Media/Html/Fact\\_sheets/egeria.html](http://idtools.org/id/aquariumplants/Aquarium_&_Pond_Plants_of_the_World/key/Aquarium_&_Pond_Plants/Media/Html/Fact_sheets/egeria.html). Acesso em: 16 jul. 2015.

Devido sua ampla capacidade propagação, esta macrófita domina os ambientes que ocupa (POTT; POTT, 2000) e tem boa capacidade de adaptação em ambientes alterados pelas ações antrópicas e ambientes aquáticos artificiais. Desta forma, *E. najas* é considerada daninha em alguns casos, sendo necessárias ações de manejo específicas para controle de sua população (THOMAZ; BINI, 1998; THOMAZ, 2002). O crescimento exagerado e fora do controle de *E. najas*, assim como outras macrófitas aquáticas, pode gerar prejuízos para as atividades de navegação e geração de energia elétrica (MARTINS et al., 2003).

Alguns aspectos relacionados à decomposição de *E. najas* já foram retratados em outros trabalhos. Dentre eles destacam-se estudos sobre influência da temperatura e atividade enzimática (CARVALHO; THOMAZ; BINI, 2005; GIMENES; CUNHA-SANTINO; BIANCHINI JÚNIOR, 2013) e o consumo de oxigênio (PERET; BIANCHINI JÚNIOR, 2004; BIANCHINI JÚNIOR; PERET; CUNHA-SANTINO, 2006; BIANCHINI JÚNIOR; CUNHA-SANTINO; PERET, 2008) na decomposição da macrófita.

### **3.3 Antimicrobianos escolhidos para o estudo**

#### **3.3.1 Oxitetraciclina**

O antibiótico oxitetraciclina (OTC) (Figura 2.6) é um composto pertencente ao grupo das tetraciclina, descobertas por Benjamin Duggar, em 1945. A primeira substância isolada dessa família de antimicrobianos foi a clortetraciclina, produzida naturalmente no processo fermentativo da bactéria *Streptomyces aureofaciens*. O isolamento da oxitetraciclina foi realizado a partir da produção natural dessa substância pela bactéria *Streptomyces rimosus*, dois anos mais tarde (BORGHI; PALMA, 2014). A partir desses dois compostos, novas estruturas moleculares foram sintetizadas e hoje existe uma considerável variedade de substâncias semissintéticas com a mesma estrutura base conhecida como tetraciclina (CHOPRA; ROBERTS, 2001).

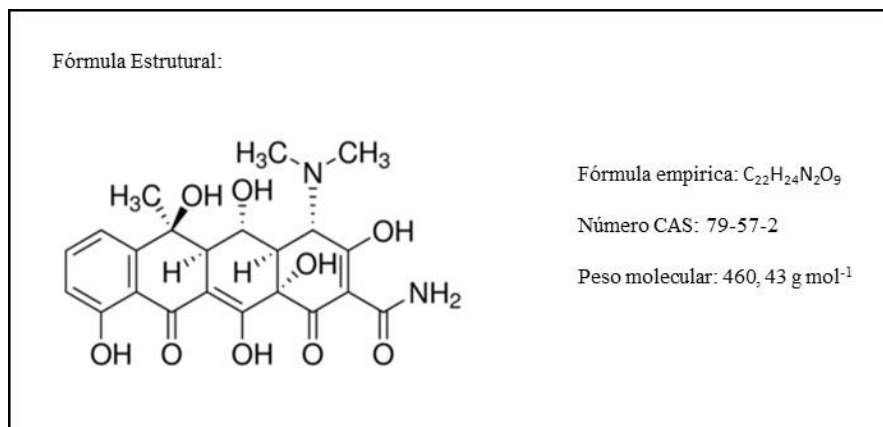


Figura 2.6 – Fórmula estrutural, fórmula empírica, número CAS (Chemical Abstracts Service) e peso molecular da Oxitetraciclina. Extraído de: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/o040000?lang=pt&region=BR>. Acesso em: 21 fev. 2015.

A OTC é um antibiótico de amplo espectro, com ação bacteriostática, usado no tratamento de doenças em humanos, animais e como promotor de crescimento de animais de corte, quando em doses subterapêuticas. A OTC também é aplicada em lavouras de tomate, batata, feijão, pepino e pêssego para tratar e evitar doenças bacterianas nas plantações (HERNÁNDEZ; BORRULL; CALULL, 2003; MAIA et al., 2009). Juntamente com as outras substâncias da família das tetraciclina é um dos antimicrobianos mais prescritos em todo mundo (KÜMMERER, 2009a). Devido sua baixa biodisponibilidade, após administrada, é uma droga pouco metabolizada e excretada principalmente pela urina na sua forma parental (CVMP, 1995). A ocorrência de resíduos de oxitetraciclina no ambiente já foi relatada por diversos autores e pode ser importante do ponto de vista ambiental (KOLPIN et al., 2002; CALAMARI et al., 2003; GAGNÉ; BLAISE; ANDRÉ, 2006; HU; ZHOU; LUO, 2010).

### 3.3.2 Imazalil

Imazalil (IMZ) (Figura 2.7) é um fungicida sintético de amplo espectro, pertencente ao grupo químico do imidazol, registrado em 1983 pela Janssen Pharmaceutica (USEPA, 2005). É um composto atuante sobre fungos filamentosos e leveduras. Agentes antifúngicos do grupo imidazol são amplamente utilizados na proteção contra infecções nas atividades agrícolas, principalmente prevenção de doenças pós-colheita. O IMZ é mais especificamente utilizado no controle de doenças provocadas por fungos em culturas de banana, cítricos, maçã, mamão, manga, melão entre outras (MENEAU; SANGLARD, 2005).

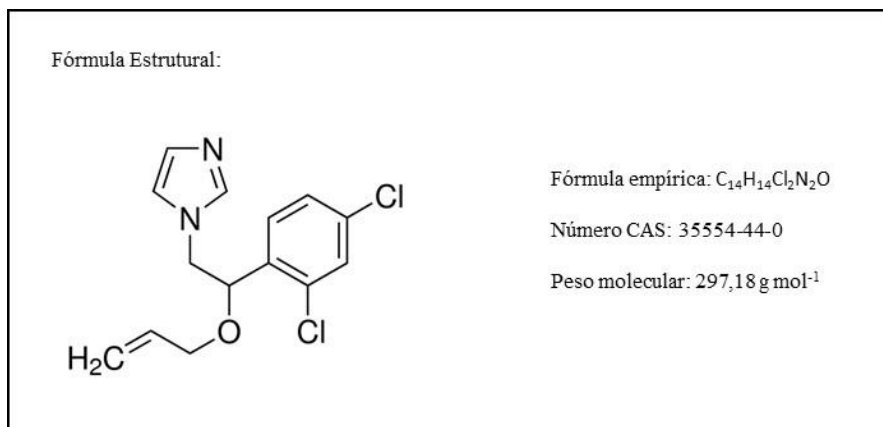


Figura 2.7 – Fórmula estrutural, fórmula empírica, número CAS (Chemical Abstracts Service) e peso molecular do imazalil. Extraído de: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/32007?lang=pt&region=BR>. Acesso em: 21 fev. 2015.

O IMZ é também princípio ativo de alguns medicamentos utilizados principalmente na medicina veterinária, sendo nesse caso referenciado como enilconazol. Na medicina veterinária a utilização de enilconazol está presente desde o controle de doenças fúngicas em animais de pequeno porte como cachorros e gatos, até no controle de doenças em animais de corte como aves e bovinos. O composto é também utilizado na limpeza e desinfecção de áreas de criação, como os aviários, e setores industriais de diversos segmentos (NOBRE et al., 2002; BOSSCHE et al., 2003; ROCHETTE; ENGELEN; BOSSCHE, 2003; GISI, 2014).

Os trabalhos que reportam a ocorrência de resíduos de IMZ no ambiente indicam seu uso na agricultura como a maior fonte de contaminação (CASTILLO et al., 2000; GÓMEZ et al., 2012).

### 3.4 Decomposição de *Egeria najas* Planch

Bioensaios de decomposição da *E. najas* em água foram desenvolvidos em câmaras de decomposição, em condições aeróbia e anaeróbia, considerando quatro tratamentos para cada condição experimental:

- ✓ Tratamento 1: controle – apenas macrófita e água;
- ✓ Tratamento 2: macrófita e água com adição de OTC;
- ✓ Tratamento 3: macrófita e água com adição de IMZ;
- ✓ Tratamento 4: macrófita e água com adição de mistura de OTC e IMZ.



### **3.4.1 Sensibilidade da comunidade microbiana heterotrófica da água da Represa do Beija-Flor e determinação das concentrações de oxitetraciclina e imazalil experimentais**

As concentrações de OTC e IMZ utilizadas nos bioensaios foram definidas a partir de testes de sensibilidade da comunidade microbiana heterotrófica da coluna d'água da Represa do Beija-Flor aos referidos antimicrobianos, segundo método de diluição em ágar M7-A6 descrito pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2003), com modificações apresentadas a seguir.

Para garantir que os resultados fossem representativos da comunidade microbiana heterotrófica da represa, foram definidos três pontos de coleta, identificados na Figura 2.4, sendo o primeiro (I) próximo à margem da represa (21° 36.234' S e 47° 47.849' O) e da desembocadura do córrego Beija-Flor; o segundo (II) na região limnética da represa, próximo ao banco das macrófitas onde foram coletadas as amostras de *E. najas* para bioensaios descritos posteriormente (21° 36.288' S e 47° 47.903' O); e o terceiro (III) próximo à saída de água do sistema (21° 36.503' S e 47° 48.059' O). Para cada ponto amostral, foi determinada a demanda bioquímica por oxigênio (DBO) (APHA, 1998). As variáveis limnológicas temperatura, pH e oxigênio dissolvido (OD) foram mensuradas pela sonda Horiba Water Quality Checker (U-10), e a turbidez, mensurada pelo turbidímetro Hach, modelo 2100P, também para cada ponto amostral. O carbono orgânico total (COT) e nitrogênio total (NT) foram analisados pelo analisador Shimadzu, modelo TOC-L, após filtração das amostras de água em membranas de acetato de celulose, diâmetro de 47 mm e poro de 0,45 µm (Whatman). Os teores de fósforo total (PT) foram determinados de acordo com protocolo de Allison (2008). As amostras de água da represa dos três pontos foram coletadas na totalidade da coluna d'água como uma amostra integrada, armazenadas em frascos de vidro âmbar e levadas ao laboratório sob refrigeração, a 4 °C.

No mesmo dia de coleta, 100 µL das amostras de água de cada ponto de coleta, sem diluição, foram inoculadas por espalhamento em placas de Petri (100 x 15 mm) contendo meio de cultura sólido. Para crescimento de colônias bacterianas e avaliação da concentração de efeito de OTC sobre a comunidade, foram utilizados os meios de cultura ágar *Casein-Peptide-Starch* (CPS), de acordo com composição descrita em (MAKI et al., 1986), e ágar Nutriente (AN) (Difco – Lot 2340019). Os dois meios de cultura foram suplementados com sete diferentes concentrações do antibiótico OTC (C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub> HCl

- *Oxytetracyclin hydrochloride* VETRANAL/ Fluka, pureza = 97% / Sigma-Aldrich Co.): 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 e 32,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As placas foram incubadas a 27 °C, por 48 horas.

Para crescimento de colônias fúngicas e avaliação da concentração de efeito de IMZ sobre a comunidade, foram utilizados para cultivo os meios ágar Sabouraud (AS) (Difco – Lot 2300357) e ágar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol (DRBC), de composição descrita em Atlas (1946). Os dois meios de cultura foram suplementados com sete diferentes concentrações do antimicrobiano IMZ ( $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}$  - Imazalil PESTANAL/ Fluka, pureza = 99,7% / Sigma-Aldrich Co.): 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 e 32,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As placas foram incubadas a 25°C, por 14 dias.

Todos os testes foram feitos em triplicata para cada concentração dos compostos e para cada ponto de coleta, como mostrado na Tabela 2.1. Ao final do tempo de incubação, foram contadas as unidades formadoras de colônia (UFC) e os resultados foram expressos em UFC  $\text{mL}^{-1}$ .

Tabela 2.1 – Meios de cultura e concentrações dos antimicrobianos OTC e IMZ utilizados para avaliação da sensibilidade da comunidade microbiana heterotrófica das águas da Represa do Beija-Flor, para os pontos de coleta I, II e III. Em que: AN = ágar nutriente; CPS = ágar *Casein-Peptone-Starch*; AS = ágar Sabouraud; DRBC = ágar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol.

OTC ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )							
Placa (Réplica)	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	16,0	Controle (s/ OTC)
1	AN CPS	AN CPS	AN CPS	AN CPS	AN CPS	AN CPS	AN CPS
2	AN CPS	AN CPS	AN CPS	AN CPS	AN CPS	AN CPS	AN CPS
3	AN CPS	AN CPS	AN CPS	AN CPS	AN CPS	AN CPS	AN CPS
Controle (s/inóculo)	AN CPS	AN CPS	AN CPS	AN CPS	AN CPS	AN CPS	Controle Geral
IMZ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )							
Placa (Réplica)	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	16,0	Controle (s/ OTC)
1	AS DRBC	AS DRBC	AS DRBC	AS DRBC	AS DRBC	AS DRBC	AS DRBC
2	AS DRBC	AS DRBC	AS DRBC	AS DRBC	AS DRBC	AS DRBC	AS DRBC
3	AS DRBC	AS DRBC	AS DRBC	AS DRBC	AS DRBC	AS DRBC	AS DRBC
Controle (s/inóculo)	AS DRBC	AS DRBC	AS DRBC	AS DRBC	AS DRBC	AS DRBC	Controle Geral

A correlação entre os meios de cultura utilizados foi avaliada de acordo com o coeficiente de correlação intraclasse (CCI) utilizando BioEstat versão 5.3 (AYRES et al., 2007). O CCI é uma estimativa da variabilidade total de medidas definida entre 0 a 1. Foi considerada replicabilidade fraca quando encontrado valor de CCI menor do que 0,4; replicabilidade satisfatória com valor maior ou igual a 0,4 e menor do que 0,75; e quando o valor encontrado foi maior ou igual a 0,75 a replicabilidade foi considerada excelente (FLEISS, 1986). A diferença entre o número de UFC de cada uma das concentrações dos antimicrobianos testadas foi analisada pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p = 0,05$ ) utilizando o programa estatístico PAST versão 2.17c (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

A diferença entre os pontos de coleta foi analisada a partir dos dados das variáveis limnológicas e do crescimento colonial de bactérias e fungos nos testes de sensibilidade. Os dados obtidos foram testados quanto as suas normalidades e a diferença entre os pontos de coleta foi avaliada por análise de variância (*analyses of variance* - ANOVA,  $p = 0,05$ ), seguida quando necessário pelo teste de Tukey, utilizando programa estatístico PAST versão 2.17c (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

### **3.4.2 Bioensaios de decomposição de *Egeria najas* Planch**

#### **3.4.2.1 Coleta e tratamento das amostras de *Egeria najas* Planch e água**

As coletas das amostras de indivíduos adultos de *E. najas* foram feitas manualmente, nos meses de abril, junho e setembro de 2013, na Represa de Beija-Flor no ponto II (Figura 2.4), onde está alocado o maior banco destas macrófitas.

As amostras de plantas foram levadas ao laboratório, lavadas com água corrente, para retirada de partículas de sedimentos, perifíton e outros materiais grosseiros que pudessem estar aderidos a elas. Em seguida, estas foram secas em estufa a 45 °C e fragmentadas, com auxílio de uma tesoura, em tamanho médio de 3,25 ( $\pm 2,70$ ) cm. Após serem homogêneas, tiveram a massa, de aproximadamente 8 g, determinada por gravimetria. Na sequência, foram acondicionadas em sacos plásticos (16 x 9,5 cm) com fechamento hermético e levadas a Companhia Brasileira de Esterilização (CBE), localizada na cidade de Cotia (São Paulo), para redução das cargas microbianas aderidas, através da aplicação de radiação gama com dose 3 kGy, por 1 hora e 30 minutos. Até o estabelecimento dos bioensaios, as amostras foram armazenadas em ambiente aclimatado a 21 °C, protegidas da luz e da umidade.

Amostras de água que serviram de inóculo para as incubações foram obtidas no mesmo ponto de coleta das macrófitas, no final do mês de maio de 2014. A coleta de água foi feita na totalidade da coluna d'água (subsuperfície e fundo) com auxílio de uma garrafa de Van Dorn. As amostras foram levadas ao laboratório, aclimatadas a 21 °C, no escuro, por cerca de 16 horas e filtradas em malha de náilon (poro de aproximadamente 400 µm) para retirada de partículas grosseiras.

### 3.4.2.2 Delineamento experimental

As câmaras de decomposição contendo detritos de *E. najas* foram elaboradas com frascos de vidro de tampa de rosca, com capacidade de 830 mL, cobertos com material plástico preto para evitar a entrada de luz. Foram estabelecidas duas condições experimentais: decomposição aeróbia e decomposição anaeróbia.

As câmaras referentes aos bioensaios de decomposição aeróbia foram mantidas sob borbulhamento de ar comprimido através da introdução de tubulação pneumática, com diâmetro interno de 4 mm, acoplada a ponteira de seringa automática com saída de ar protegida com algodão hidrofóbico. O tubo foi introduzido no frasco através de pequeno orifício feito no centro da tampa plástica destas câmaras. As câmaras relativas aos bioensaios de decomposição anaeróbia foram mantidas fechadas ao longo de todo experimento. Segundo experimento de consumo de oxigênio dos detritos de *Egeria najas* (consumo máximo de oxigênio = 699,9 mg OD/g de detrito e coeficiente de desoxigenação = 0,014/dia) realizado por Bianchini Júnior, Cunha-Santino e Peret (2008), a anaerobiose do meio foi alcançada em cerca de 2 horas.

As câmaras de decomposição foram montadas em triplicata. Os tempos de amostragem foram: 1, 3, 5, 15, 35 e 65 dias após o estabelecimento dos bioensaios. As incubações foram feitas de acordo com Bianchini Júnior, Pacobahyba e Cunha-Santino (2002) considerando a proporção de 10 g de massa seca de *E. najas* por litro de água da represa, mantidas a 21,07 (± 0,91) °C, em sala escura.

Para cada uma das condições experimentais, foram estabelecidos quatro tratamentos:

- ✓ Tratamento 1: controle – sem adição de interferentes;
- ✓ Tratamento 2: adição de OTC ( $C_{22}H_{24}N_2O_9$  HCl - Oxytetracyclin hydrochloride VETRANAL/ Fluka, pureza = 97%) – 2 µg mL<sup>-1</sup>;

- ✓ Tratamento 3: adição de IMZ ( $C_{14}H_{14}C_{12}N_2O$  - Imazalil PESTANAL/Fluka, pureza = 99,7%) –  $4\mu\text{g mL}^{-1}$ ;
- ✓ Tratamento 4: adição de mistura de OTC e IMZ – respectivamente 2 e  $4\mu\text{g mL}^{-1}$ .

As concentrações de OTC e IMZ utilizadas nos experimentos foram definidas de acordo com os resultados obtidos nos testes descritos no item 3.4.1.

Em cada tempo de amostragem, foram medidos o pH, com pH-metro Qualxtron, modelo 8010, e a condutividade elétrica (CE), com condutivímetro Digimed, modelo DM3. As câmaras de decomposição de *E. najas* foram submetidas por 3 minutos ao ultrassom Ultra Turrax IKA, modelo T10, para homogeneização das amostras. O conteúdo das câmaras com fragmentos de planta foi pré-filtrado em malha de náilon (poro de aproximadamente  $400\mu\text{m}$ ) para obtenção da MOP. Esta foi seca em estufa a  $45\text{ }^\circ\text{C}$  para determinação de massa seca por gravimetria e determinação do CO da planta pelo analisador de carbono Shimadzu modelo TOC-L, acoplado ao módulo para amostragem de sólidos, modelo SSM-5000 A.

A MOP foi convertida em base de COP utilizando a concentração de carbono obtido na análise do carbono particulado total em analisador específico Shimadzu modelo TOC-L. As fases aquosas retiradas das câmaras de decomposição foram filtradas em membrana de acetato de celulose, diâmetro de 47 mm e poro de  $0,45\mu\text{m}$  (Whatman), para análise de COD, pelo analisador de carbono Shimadzu modelo TOC-L. Esquemáticamente, o delineamento experimental está descrito na Figura 2.8.

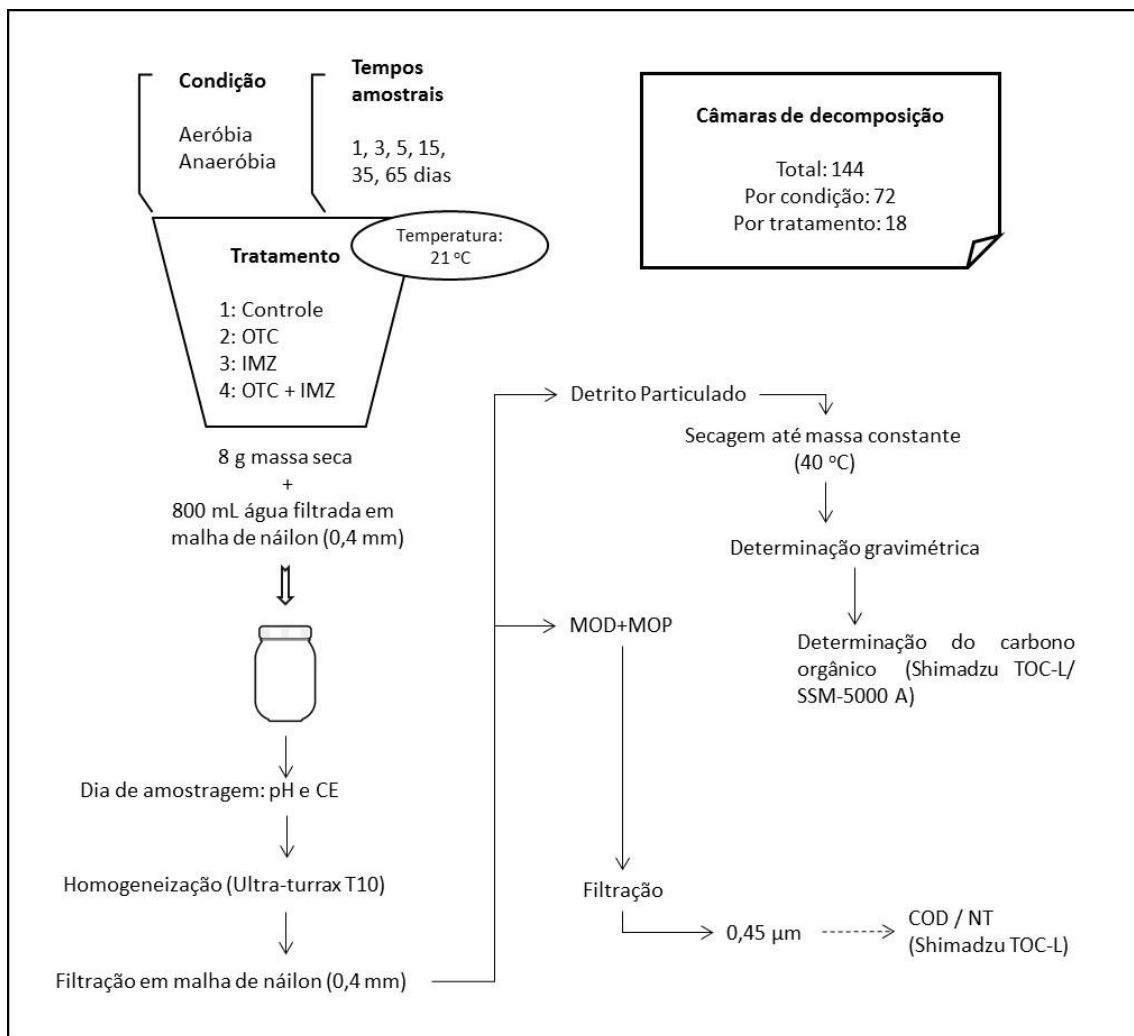


Figura 2.8 – Resumo esquemático dos tratamentos dos bioensaios de decomposição de *E. najas* e análises realizadas em cada tempo amostral.

O teor de COD foi corrigido para determinação de COD do volume total do sistema e ambos COD e COP foram convertidos em porcentagem considerando o conteúdo de cada sistema no tempo inicial como 100% para o COP (tempo 0). Os teores de carbono orgânico mineralizado foram estimados pela Equação 2.1.

$$CM_t = COT_0 - COP_t - COD_t \dots \dots \dots \text{Equação 2.1}$$

em que:  $CM_t$  = carbono mineralizado no tempo;  $COT_0$  = carbono orgânico total no início do experimento;  $COP_t$  = COP remanescente no tempo;  $COD_t$  = COD remanescente no tempo.

Para expressar a decomposição de *E. najas* adotou-se o modelo matemático proposto por Bianchini Júnior e Cunha-Santino (2008). Neste modelo, considera-se que os detritos da planta sejam heterogêneos quanto a sua composição química, apresentando

uma fração do carbono orgânico lábil/solúvel ( $COP_{LS}$ ) e outra fração do carbono orgânico refratário ( $COP_R$ ), com suas respectivas rotas de mineralização (Figura 2.9). As variações do COP ao longo do tempo foram convertidas em porcentagem e ajustadas ao modelo exponencial duplo de acordo com a Equação 2.2.

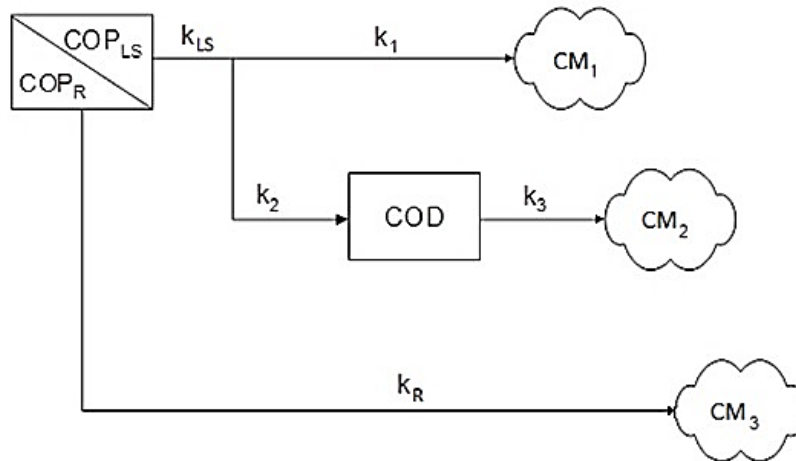


Figura 2.9 – Modelo cinético proposto para a decomposição de *E. najas*. Modificado de Bianchini Júnior e Cunha-Santino (2008). Em que:  $COP_{LS}$  = carbono orgânico particulado lábil/solúvel;  $COP_R$  = carbono orgânico particulado refratário; COD = carbono orgânico dissolvido;  $k_1$  = coeficiente de mineralização da  $COP_L$ ;  $k_2$  = coeficiente de lixiviação do  $COP_{LS}$  (igual à taxa de formação do COD);  $k_{LS}$  = coeficiente global de decaimento do  $COP_{LS}$  ( $= k_1 + k_2$ );  $k_3$  = coeficiente de mineralização do COD;  $k_R$  = coeficiente de mineralização do  $COP_R$ ;  $CM_1$  = carbono mineralizado através da rota 1 (oxidação direta);  $CM_2$  = carbono mineralizado através da rota 2 (oxidação dos solubilizados) e  $CM_3$  = carbono mineralizado através da rota 3 (oxidação da fração refratária).

$$COP = (COP_{LS}e^{-k_{LS}t}) + (COP_R e^{-k_R t}) \dots \dots \dots \text{Equação 2.2}$$

em que:  $COP_{LS}$  = teor inicial de carbono orgânico particulado lábil/solúvel (%);  $COP_R$  = teor inicial de carbono orgânico particulado refratário (%);  $k_{LS}$  = coeficiente de decaimento do  $COP_{LS}$  ( $\text{dia}^{-1}$ );  $k_R$  = coeficiente de decaimento do  $COP_R$  ( $\text{dia}^{-1}$ );  $t$  = tempo de decomposição.

Considerando a perda de massa de *E. najas* uma reação irreversível de primeira ordem, as demais etapas da cinética de decomposição da macrófita foram descritas pelas equações 2.3, 2.4, 2.5 e 2.6. Os parâmetros cinéticos foram obtidos por regressão não linear utilizando o algoritmo iterativo de Levenberg-Marquardt (PRESS et al., 1993).

$$CM_1 = \frac{k_1}{k_{LS}} COP_{LS}(1 - e^{-k_{LS}t}) \dots \dots \dots \text{Equação 2.3}$$

$$CM_2 = \frac{k_2}{k_{LS}} COP_{LS} \left( 1 + \frac{k_3}{k_{LS}-k_3} e^{-k_{LS}t} + \frac{k_T}{k_3-k_{LS}} e^{-k_3t} \right) \dots \dots \dots \text{Equação 2.4}$$

$$CM_3 = COP_R(1 - e^{-k_R t}) \dots \dots \dots \text{Equação 2.5}$$

$$CM = \sum_{i=1}^3 CM_t \dots \dots \dots \text{Equação 2.6}$$

em que:  $COP_{LS}$  = carbono orgânico particulado lábil/solúvel (%);  $COP_R$  = carbono orgânico particulado refratário (%);  $(k_1/k_{LS}) \times COP_{LS} \rightarrow COP_L$  = carbono orgânico particulado lábil (%);  $k_2/k_{LS} \times COP_{LS} \rightarrow COD$  = carbono orgânico dissolvido (%);  $CM$  = carbono mineralizado (%);  $e$  = base logaritmo natural;  $t$  = tempo (dia);  $k_{LS}$  = coeficiente global de decaimento do  $COP_{LS} \rightarrow (k_1 + k_2)$  ( $\text{dia}^{-1}$ );  $k_1$  = coeficiente de mineralização da  $COP_L$  ( $\text{dia}^{-1}$ );  $k_2$  = coeficiente de lixiviação do  $COP_{LS}$  (igual à taxa de formação do COD –  $\text{dia}^{-1}$ );  $k_3$  = coeficiente de mineralização do COD ( $\text{dia}^{-1}$ );  $k_R$  = coeficiente de mineralização do  $COP_R$  ( $\text{dia}^{-1}$ );  $CM_1$  = carbono mineralizado através da rota 1 (oxidação direta – %);  $CM_2$  = carbono mineralizado através da rota 2 (oxidação dos solubilizados – %) e  $CM_3$  = carbono mineralizado através rota 3 (oxidação da fração refratária – %).

Os tempos de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) da decomposição das frações lábil/solúvel e refratária do detrito foram calculados utilizando a Equação 2.7.

$$t^{1/2} = \ln(0,5) / -k \dots \dots \dots \text{Equação 2.7}$$

em que:  $k$  = coeficiente de mineralização de cada fração de carbono.

As diferenças entre as condições experimentais e os tratamentos foram analisadas por ANOVA ( $p = 0,05$ ) utilizando o programa estatístico PAST versão 2.17c (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

### 3.4.3 Diversidade do Domínio Bacteria por análises de PCR e DGGE

#### 3.4.3.1 Obtenção de biomassa

As técnicas de PCR (*polymerase chain reaction* – reação de polimerase em cadeia) e DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis* – eletroforese em gel de gradiente desnaturante) foram aplicadas à fração aquosa das amostras de água dos bioensaios descritos anteriormente, para os tempos amostrais 1, 15 e 65 dias, para as duas condições experimentais. Após desmontagem das câmaras de decomposição, a água retirada de cada sistema foi filtrada em malha de náilon (poro de aproximadamente 400  $\mu\text{m}$ ), homogeneizada e em seguida uma alíquota de 100 mL foi retirada para obtenção de biomassa microbiana.



Para cada tratamento, foi feita uma amostra integrada das réplicas inicialmente montadas, gerando uma amostra final de 300 mL. Essa amostra foi acondicionada em tubos de centrífuga de polipropileno de fundo cônico e centrifugadas a 10.000 rpm, 4 °C por 10 minutos, utilizando centrífuga Eppendorf Centrifuge/ 5804R. O sobrenadante foi descartado e o conteúdo centrifugado foi armazenada a -20 °C, para posterior extração de ADN (ácido desoxirribonucleico) e aplicação das técnicas de PCR e DGGE.

#### **3.4.3.2 Extração de ADN**

Os ADNs das amostras foram extraídos de acordo com protocolo modificado de Griffiths et al. (2000). Na biomassa úmida foi adicionado 0,3 g de pérolas de vidro (*glassbeads*), 1 mL de tampão PBS (*phosphate buffered saline*), 1 mL de fenol tamponado com TRIS (*(Dimethylaminomethyl)phenol*) e 1 mL de clorofórmio. A mistura foi levada ao vórtex por 30 segundos para homogeneização e centrifugada a 6.000 rpm, a 4 °C por 10 minutos. Após centrifugação, foi retirado 1 mL do sobrenadante que foi então acondicionado em tubos de centrífuga de polipropileno de fundo cônico com 2 mL de capacidade.

Em seguida, se iniciaram as etapas de purificação do ADN. Para tanto, 1 mL de fenol tamponado com TRIS foi adicionado nos tubos. A mistura foi homogeneizada rapidamente no vórtex e centrifugada a 6.000 rpm, a 4 °C por 10 minutos.

Cerca de 850 µL do sobrenadante foram transferidos para outro tubo de centrífuga de 2 mL de capacidade, acrescidos do mesmo volume de clorofórmio. A mistura foi homogeneizada rapidamente no vórtex e centrifugada nas mesmas condições descritas anteriormente, utilizando centrífuga Eppendorf Centrifuge, modelo 5417R.

O volume de 650 µL do sobrenadante foi transferido para tubo de centrífuga de 1,5 mL de capacidade e acrescido do mesmo volume de clorofórmio. A mistura foi homogeneizada rapidamente em vórtex e centrifugada nas mesmas condições. Por fim, 100 µL do sobrenadante foram transferidos para tubos de centrífuga de 200 µL, armazenados a -20 °C e 300 µL foram transferidos para outro tubo de centrífuga com 1,0 mL de capacidade.

A viabilidade do ADN extraído foi verificada em análise por eletroforese em gel de agarose a 0,8% (m v<sup>-1</sup>), em equipamento Eletrophoresis Power Supply – EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech). Para isso, foram utilizados 5 µL da alíquota final e 2 µL de padrão *High DNA Mass Ladder Invitrogen* homogeneizados com 1 µL de corante

*Loading Dye1 – LGC Biotecnologia*. As condições de corrida foram estabelecidas em 75 V, 300 mA, 30 minutos. O gel foi observado no trans-iluminador UV Stratagene – Eagle Eye II.

Seguiram-se as etapas de desidratação e precipitação do ADN. Aos 300 µL finais, foi acrescentado 1 mL de etanol (95%) resfriado (4 °C). A amostra foi homogeneizada manualmente e armazenada a -20 °C, por 24 horas. Após esse período, a amostra foi novamente homogeneizada manualmente, em movimentos suaves, e centrifugada a 10.000 rpm, a 4 °C por 10 minutos.

O sobrenadante foi descartado e, ao conteúdo do tubo, foram adicionados 500 µL de etanol (70%) resfriado (4 °C). A amostra foi homogeneizada manualmente e centrifugada nas mesmas condições descritas anteriormente. O sobrenadante foi descartado e o ADN restante foi desidratado em temperatura ambiente por cerca de 24 horas e armazenado a -20 °C.

### 3.4.3.3 PCR e DGGE

Para a reação de PCR foi utilizado o ADN desidratado. As amostras foram descongeladas e reidratadas com 100 µL de tampão *Elution Buffer type 4* (10 mM Tris-HCl, pH 8.0) do Illustra GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit (GE Healthcare).

A concentração e pureza dos ADNs foram analisadas em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo-Scientific) respectivamente pelos valores de absorvância em comprimento de onda de 260 nm e pela relação do comprimento de onda 260/280 nm (SAMBROOK; FRITSCHI; MANIATIS, 1989).

Em seguida, as reações de PCR foram realizadas em termociclador Eppendorf (AG – 22331 Hamburg) utilizando os *primers* F-968-GC e R-1401, para amplificar a região 16S do domínio Bacteria, cujas sequências estão descritas na Tabela 2.2, e programação apresentada na Tabela 2.3 (NÜBEL et al., 1996).

Tabela 2.2 – *Primers* para amplificação da região 16S do rARN (ácido ribonucleico ribossomal) para o Domínio Bacteria (NÜBEL et al., 1996).

<i>Primers</i>	<i>Sequência (5' – 3')</i>
F-968-GC	5' – CGC CCG GGG CGC CCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC – 3'
R-1401	5' – CGG TGT GTA CAA GAC CC – 3'

Tabela 2.3 – Programação do termociclador para amplificação do rARN (ácido ribonucleico ribossomal) 16S para o Domínio Bacteria (NÜBEL et al., 1996).

Desnaturação Inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final	Resfriamento
95 °C	94 °C	56 °C	72 °C	72 °C	4 °C
7'	45''	45''	1'	10'	
	35 ciclos				

Os produtos das reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% (m v<sup>-1</sup>), em equipamento Eletrophoresis Power Supply – EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech). Para isso, foram utilizados 5 µL dos produtos da PCR e 2 µL de padrão *Low DNA Mass Ladder Invitrogen* homogeneizados com 1 µL de corante *Loading Dye1 – LGC Biotecnologia*. As condições de corrida foram estabelecidas em 75 V, 300 mA, 30 minutos. O gel foi observado no trans-iluminador *UV Stratagene – EagleEye II*.

Volumes totais de 20 µL dos produtos da PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida a 8% (m/v), em TAE 0,5X (Tris:Acetato:EDTA), com gradiente linear desnaturante (formamida e ureia) de 45 e 65%. A corrida foi realizada com corrente de 75 V, a 60 °C por 16 horas utilizando equipamento DCode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories). O gel foi corado com brometo de etídeo por 15 minutos e lavado em água ultrapura Milli-Q (Millipore). A leitura das bandas foi feita no trans-iluminador *UV Stratagene – Eagle Eye II*.

Os perfis das bandas dos géis de DGGE foram analisados pelo software BioNumeric 3.5 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). As semelhanças dos perfis entre os tratamentos da mesma condição experimental, ou seja, aeróbia e anaeróbia, foram analisadas estatisticamente utilizando o algoritmo UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic averages*) com o coeficiente de Jaccard. O índice de diversidade de Shannon-Wiener foi utilizado para comparar as mudanças na diversidade da estrutura da comunidade microbiana e calculado usando Equação 2.8 de acordo com ABREU et al. (2010).

$$H = -\sum(P_i \ln(P_i)) \dots \dots \dots \text{Equação 2.8}$$

em que: H = índice de diversidade, P<sub>i</sub> = n<sub>i</sub>/N - intensidade de cada banda (n<sub>i</sub> = altura individual da banda na curva densitométrica, N = soma das alturas de todos os picos na curva densitométrica).

### 3.4.4 Densidade bacteriana

A estimativa da densidade bacteriana foi feita a partir contagem de células em microscópio de epifluorescência Olympus modelo BHS – 313, equipado com luz de mercúrio HBO 200, conjunto de filtros para luz UV, em aumento de 1250 X, e equipado com ocular de Whipple (10 x 10). A contagem foi feita nas mesmas amostras em que foram aplicadas as técnicas de PCR e DGGE. As amostras de água das câmaras de incubação dos tempos 1, 15 e 65 dias foram filtradas em malha de náilon (poro de aproximadamente 400 µm), homogeneizadas e em seguida uma alíquota de 20 mL foi acondicionada em frascos de vidro tipo âmbar com 30 mL de capacidade e fixadas com solução de formalina neutra (Synth), em concentração final de 2%. As amostras foram mantidas refrigeradas a 4 °C até análise.

No momento da contagem, as amostras foram homogeneizadas, as réplicas de cada tratamento foram integradas para formar uma única amostra para cada tratamento. Alíquotas das amostras foram diluídas em água destilada estéril, quando necessário, e coradas por 30 minutos com fluorocromo 4', 6- *diamidino-2-phenilindol* (DAPI) (Sigma Aldrich Co.). Em seguida foram filtradas em membranas de policarbonato pretas (Nucleopore) de 0,22 µm de abertura de poro e 25 mm de diâmetro, apoiadas sobre membrana de proteção 0,22 µm de abertura de poro e 25 mm de diâmetro.

A densidade de células bacterianas por mililitro de amostra foi calculada segundo Jones (1979) de acordo com a Equação 2.9.

$$D = \frac{Y \times A \times d}{a \times v} \dots \dots \dots \text{Equação 2.9}$$

em que: D = densidade bacteriana (células mL<sup>-1</sup>); Y = número médio de células por área de contagem; A = área de filtração da membrana (mm<sup>2</sup>); d = diluição; a = área do campo de contagem na lente de aumento selecionada (mm<sup>2</sup>); v = volume filtrado da amostra.

## 4 Resultados e discussão

### 4.1 Sensibilidade da comunidade microbiana heterotrófica da água da Represa do Beija-Flor e determinação das concentrações de oxitetraciclina e imazalil experimentais

Os pontos de coleta de água para análise de sensibilidade da comunidade microbiana heterotrófica da represa do Beija-Flor foram estatisticamente semelhantes quanto às variáveis NT e DBO. Os valores médios para essas variáveis foram  $0,29 (\pm 0,02) \text{ mg L}^{-1}$  e  $1,11 (\pm 0,13) \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente. As variáveis pH, OD, turbidez, PT, COT diferiram significativamente entre os pontos. De acordo com teste Tukey, a diferença observada entre os pontos para essas variáveis foi gerada pelos dados obtidos para o ponto III. Este ponto de coleta é o mais próximo à saída de água da represa e portanto, tem maior quantidade de matéria orgânica carregada pela correnteza. Os resultados das variáveis limnológicas estão apresentados na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 – Valores das variáveis limnológicas medidas nos três pontos amostrais: pH; OD = oxigênio dissolvido ( $\text{mg L}^{-1}$ ); turbidez (UNT); DBO = demanda bioquímica por oxigênio ( $\text{mg L}^{-1}$ ); PT = fósforo total ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ); temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ); NT = nitrogênio total ( $\text{mg L}^{-1}$ ); COT = carbono orgânico total ( $\text{mg L}^{-1}$ ). dp = desvio-padrão.

	valor- <i>p</i>	Ponto I	Ponto III	Ponto III	Média
<b>pH</b>	0,0006	4,40	4,40	4,71	<b>4,51</b>
dp		0,01	0,03	0,03	0,18
<b>OD</b>	0,0044	3,78	4,34	4,76	<b>4,29</b>
dp		0,10	0,13	0,20	0,49
<b>Turbidez</b>	0,0002	2,80	2,52	2,17	<b>2,50</b>
dp		0,04	0,28	0,04	0,32
<b>DBO</b>	0,4572	0,99	1,09	1,25	<b>1,11</b>
dp		0,16	0,37	0,11	0,13
<b>PT</b>	0,0132	7,80	7,32	16,88	<b>10,67</b>
dp		3,28	1,59	4,61	5,38
<b>NT</b>	0,2455	0,30	0,26	0,31	<b>0,29</b>
dp		0,03	0,03	0,01	0,02
<b>COT</b>	0,0244	5,72	4,59	6,93	<b>5,75</b>
dp		0,10	0,13	0,12	1,17
<b>Temperatura</b>		19,70	20,70	22,10	<b>20,8</b>

Com relação ao número de UFC, não houve diferença significativa entre os pontos amostrados para todos os meios utilizados. Nos controles, utilizando os meios CPS e AN sem adição de OTC, houve crescimento médio entre 797 a 3.100 UFC mL<sup>-1</sup> de colônias bacterianas, respectivamente. Nos controles, utilizando os meios DRBC e AS sem adição de IMZ, houve crescimento médio entre 27 e 77 UFC mL<sup>-1</sup> de colônias fúngicas, respectivamente. Os meios de cultura CPS e AN apresentaram CCI maiores do que 0,75 para todos os pontos amostrais, o que indica excelente replicabilidade entre os meios no que se refere ao crescimento de colônias bacterianas. O mesmo não foi observado para os meios DRBC e AS, que apresentaram correlação satisfatória e fraca para crescimento de colônias fúngicas utilizando como inóculo a água coletada nos três pontos amostrais (Tabela 2.5).

Tabela 2.5 – Coeficiente de correlação intraclassa (CCI) para os meios de cultura de crescimento bacteriano (AN e CPS) e para os meios de cultura de crescimento fúngico (AS e DRBC), utilizando os resultados de unidades formadoras de colônia (UFC).

	AN x CPS			DRCB x AS		
	Ponto I	Ponto II	Ponto III	Ponto I	Ponto II	Ponto III
<i>p</i>	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0844	0,0093	0,0713
CCI	0,8813	0,9438	0,9275	0,28	0,4616	0,2974
Replicabilidade	Excelente	Excelente	Excelente	Fraca	Satisfatória	Fraca

Apesar do ponto III ter sido considerado estatisticamente diferente para algumas variáveis, os três pontos de coleta foram semelhantes quanto a DBO e o crescimento de colônias bacterianas e fúngicas. Desta forma, para a escolha da concentração de OTC usada nos experimentos, foram considerados os resultados médios de UFC mL<sup>-1</sup> dos três pontos amostrais que foram semelhantes nos dois meios de cultura.

Nas placas com adição de OTC, houve diferença significativa no número de colônias em relação ao controle ( $p = 0,0139$ ), logo na primeira concentração testada de 0,5 µg mL<sup>-1</sup>. Para a escolha da concentração a ser utilizada no experimento, foram testadas estatisticamente as diferenças no número de UFC entre as concentrações de OTC e não entre elas e o controle. A concentração de 2,0 µg mL<sup>-1</sup> foi a escolhida por ter sido a primeira a apresentar diferença significativa ( $p = 0,0132$ ) no crescimento bacteriano em relação às menores concentrações.

Para a escolha da concentração de IMZ usada no experimento, foram avaliadas as diferenças no número de UFC entre as concentrações de IMZ para cada meio de cultura,

já que eles não apresentaram correlação satisfatória. Para o meio DRBC houve diferença significativa ( $p = 0,0056$ ) no número de colônias na concentração de  $8 \mu\text{g mL}^{-1}$  e para o meio AS a diferença ocorreu em  $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $p = 0,0131$ ). Desta forma, a concentração escolhida para ser utilizada nos experimentos foi a intermediária entre os valores obtidos nos dois meios de cultura, ou seja,  $4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

## 4.2 Decomposição de *Egeria najas* Planch

### 4.2.1 Variações de pH

As variações temporais do pH nas câmaras de decomposição para os quatro tratamentos e para as duas condições experimentais estão apresentadas na Figura 2.10. O pH da amostra inicial, antes do início dos bioensaios foi de  $6,42 (\pm 0,26)$ . Houve diferença significativa ( $p = 0,0093$ ) para os valores de pH entre as condições experimentais, mas não foi observada diferença entre os tratamentos para cada uma das condições.

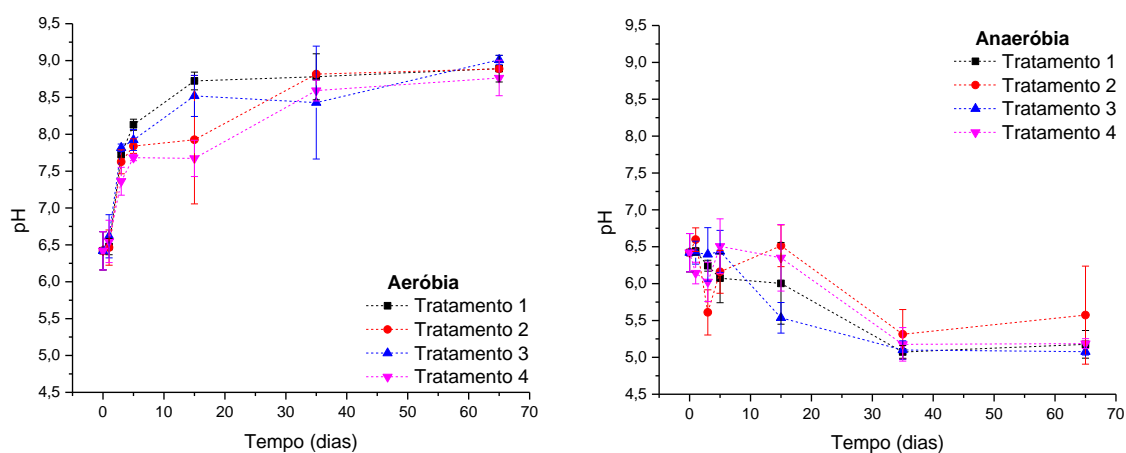


Figura 2.10 – Variação do pH ao longo do tempo para os bioensaios de decomposição aeróbia e decomposição anaeróbia. Tratamento 1 = Controle, Tratamento 2 = Adição de OTC, Tratamento 3 = Adição de IMZ, Tratamento 4 = Adição de mistura de OTC e IMZ.

A tendência dos valores de pH na decomposição aeróbia foi de aumento para todos os tratamentos até o último dia de amostragem. Do início ao fim do tempo de experimento, ou seja, do dia 1 ao dia 65, o pH no Tratamento 1 variou de  $6,48 (\pm 0,11)$  a  $8,89 (\pm 0,18)$ ; no Tratamento 2 variou de  $6,46 (\pm 0,24)$  a  $8,89 (\pm 0,02)$ ; no Tratamento 3 foi de  $6,62 (\pm 0,29)$  a  $9,1 (\pm 0,06)$ , no Tratamento 4 de  $6,55 (\pm 0,29)$  a  $8,76 (\pm 0,24)$ .

Para a decomposição anaeróbia, a tendência do pH foi de diminuição ao longo do tempo, com estabilização a partir do trigésimo quinto dia. A variação do início ao fim do experimento foi de 6,44 ( $\pm 0,05$ ) a 5,18 ( $\pm 0,19$ ) no Tratamento 1; 6,60 ( $\pm 0,16$ ) a 5,57 ( $\pm 0,66$ ) no Tratamento 2; 6,42 ( $\pm 0,16$ ) a 5,08 ( $\pm 0,05$ ) no Tratamento 3; 6,14 ( $\pm 0,15$ ) a 5,19 ( $\pm 0,07$ ) no Tratamento 4.

A tendência do pH ao longo do tempo foi diferente para as duas condições experimentais. Em aerobiose, o pH aumentou ao longo do tempo, e foi maior em relação ao processo anaeróbio em todos os tempos amostrais. O mesmo padrão foi observado na decomposição de detritos de *Eichhornea azurea*, em estudo desenvolvido por Cunha-Santino, Bianchini Júnior e Okawa (2010). Do primeiro dia de amostragem até o quinto dia, observou-se a tendência de queda nos valores de pH em todos os tratamentos, na condição anaeróbia. As tendências às estabilizações dos valores de pH ocorreram após o trigésimo quinto dia para as duas condições de incubação.

A acidificação do meio durante a decomposição de detritos vegetais, principalmente nos tempos iniciais, foi também observada por Carvalho, Thomaz e Bini et al. (2005); Cunha-Santino, Bianchini Júnior e Okawa (2010) e Gimenes (2011). Os processos de respiração, com depleção do oxigênio dissolvido ainda presente no meio e liberação de dióxido de carbono pelos microrganismos heterotróficos, fazem com que ocorra queda do pH no início da decomposição anaeróbia. O dióxido de carbono em água forma um ácido fraco, segundo a equação  $\text{CO}_2 (\text{g}) + \text{H}_2\text{O} (\text{l}) \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 (\text{aq})$ , que sofre a primeira dissociação em íons de hidrogênio e bicarbonato, como descrito na equação  $\text{H}_2\text{CO}_3 (\text{aq}) \leftrightarrow \text{H}^+ (\text{aq}) + \text{HCO}_3^- (\text{aq})$ . Os íons bicarbonato podem ainda sofrer mais uma dissociação em íons de hidrogênio e carbonato,  $\text{HCO}_3^- (\text{aq}) \leftrightarrow \text{H}^+ (\text{aq}) + \text{CO}_3^{2-} (\text{aq})$ , o que reduz o pH do meio (GODSHALK; WETZEL, 1978; WETZEL, 2001).

A decomposição do detrito vegetal pode gerar ácidos orgânicos a partir da ação de bactérias acidogênicas sobre os produtos hidrolisados da matéria orgânica. Esse processo é comum durante a decomposição na ausência de oxigênio sendo responsável pela queda do pH mesmo após longo tempo de experimento. Sob condição de anaerobiose, são atuantes bactérias anaeróbias e facultativas que convertem compostos orgânicos complexos originados da hidrólise inicial (carboidratos, lipídios e proteínas) em compostos mais simples, como ácidos voláteis (FUENTES et al., 2008).

Assim, a tendência de queda do pH ao menos até o 35º dia da decomposição anaeróbia evidencia que a formação de ácidos prevaleceu sobre a utilização destes nas etapas seguintes da decomposição. A mineralização da matéria orgânica sob anaerobiose



se completa após a acetogênese e metanogênese, com consequente elevação do pH e produção final de metano (CH<sub>4</sub>) e dióxido de carbono (MASSEY; POHLAND, 1978), além de traços de outros gases e alguns ácido de baixa massa molecular (BENGTSSON et al., 2008).

O aumento e estabilização do pH indicam a prevalência de íons bicarbonato, com complexão de produtos H<sup>+</sup>, e processos de humificação, que parecem ser mais rápidos na condição aeróbia (CUNHA-SANTINO; BIANCHINI JÚNIOR, 2006). As substâncias húmicas (ácidos húmicos e fúlvicos), formadas a partir da ação microbiana, atuam no tamponamento do meio, impedem a queda do pH e indicam estabilização do composto (WETZEL, 2001).

#### 4.2.2 Variações de CE

Em relação às variações das CE, apresentadas na Figura 2.11, foram observados aumentos dos valores para todos os tratamentos logo no primeiro dia de incubação, com diferença significativa entre as duas condições ( $p = 0,0002$ ). Na decomposição aeróbia, a estabilidade da CE foi observada a partir do décimo quinto dia de experimento, tendo diminuído ao 65º dia em relação ao 35º dia. Na decomposição anaeróbia, a variável manteve-se estável a partir do tempo amostral 35 dias. O valor de CE da amostra inicial, antes do estabelecimento dos experimentos, foi  $18,31 (\pm 0,29) \mu\text{s cm}^{-1}$ .

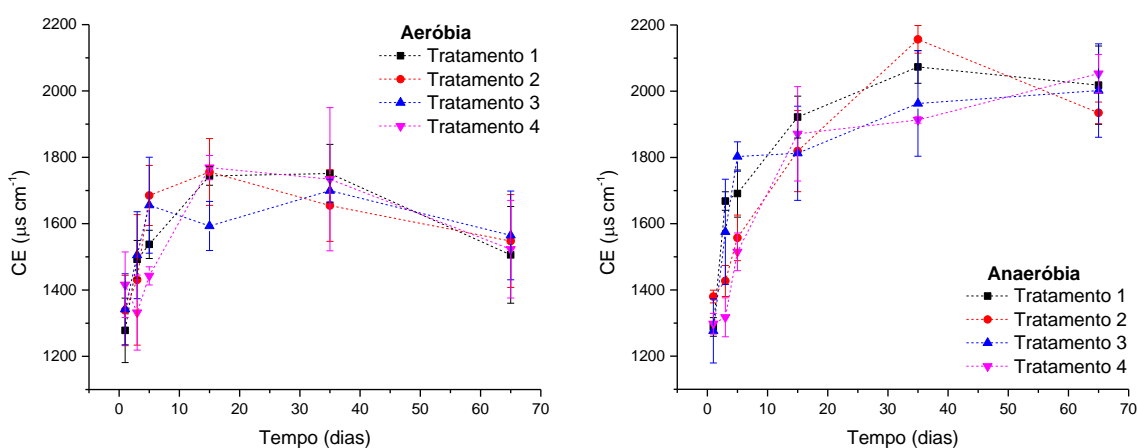


Figura 2.11 – Variação da condutividade elétrica ao longo do tempo para os bioensaios de decomposição aeróbia e decomposição anaeróbia. Tratamento 1 = Controle, Tratamento 2 = Adição de OTC, Tratamento 3 = Adição de IMZ, Tratamento 4 = Adição de mistura de OTC e IMZ.

Não houve diferença significativa para a CE entre os tratamentos para as duas condições experimentais. As médias de CE, em  $\mu\text{s cm}^{-1}$ , obtidas na decomposição aeróbia, do início e fim do experimento foram 1.278,33 ( $\pm 97,17$ ) e 1.506,00 ( $\pm 145,84$ ) no Tratamento 1; 1.338,33 ( $\pm 105,99$ ) e 1.547,67 ( $\pm 139,89$ ) no Tratamento 2; 1.342,00 ( $\pm 106,93$ ) e 1.564,67 ( $\pm 133,67$ ) no Tratamento 3; 1.416,00 ( $\pm 98,81$ ) e 1.523,00 ( $\pm 147,23$ ) no Tratamento 4.

Na decomposição anaeróbia, as médias de CE, em  $\mu\text{s cm}^{-1}$ , para o Tratamento 1 foram de 1.288,33 ( $\pm 28,15$ ) e 2.018,33 9 ( $\pm 118,15$ ); para o Tratamento 2 de 1.380,00 ( $\pm 19,29$ ) e 1.934,67 ( $\pm 32,62$ ); para o Tratamento 3 de 1.276,33 ( $\pm 97,00$ ) e 2.002,00 (141,10); e para o Tratamento 4 de 1.298,00 ( $\pm 31,24$ ) e 2.053,33 ( $\pm 57,74$ ).

Liberações de compostos ionizáveis das frações protoplasmáticas dos detritos de *E. najas* ocorreram desde as primeiras etapas da decomposição, sendo esse processo refletido no aumento da CE nas condições aeróbia e anaeróbia. O decréscimo e/ou estabilização dos valores de CE observados no trigésimo quinto dia de experimento, para as duas condições experimentais, mostrou que a partir desse tempo há maior assimilação microbiana do que liberação/ formação de eletrólitos a partir dos processos de lixiviação/ solubilização. A abundância dos lixiviados prontamente disponíveis para a mobilização microbiana contribui para que as etapas seguintes do processo de decomposição sejam processadas (VÄHÄTALO; SONDERGAARD, 2002; PARK; CHO, 2003; CUNHA-SANTINO; BIANCHINI JÚNIOR, 2015). Assume-se que os processos metabólicos microbianos sob aeração sejam mais eficientes e mais rápidos do que o metabolismo microbiano anaeróbio. Assim, a relação dos processos de liberação de compostos ionizáveis e assimilação microbiana são mais intensos sob elevada disponibilidade de OD o que foi refletido nos valores mais baixos de CE para os experimentos na condição aeróbia.

A formação de lixiviados da degradação de macrófitas é um processo rápido e intenso desde as primeiras 24 horas (WEBSTER; BENFIELD, 1986). Além da fração inorgânica, também fazem parte do lixiviado os compostos orgânicos como carboidratos, polifenóis e proteínas (ALBER; VALIELA, 1994). Os valores de CE observados nas câmaras de decomposição foram função, portanto, das características e composição intrínseca do detrito (FONSECA et al., 2014). No caso da *E. najas* sabe-se que, por esta ser uma planta submersa e fixa, existem poucos tecidos rígidos de sustentação e mais tecidos de características lábeis e solúveis em água, i.e. frações protoplasmáticas.

Em estudo sobre a anatomia do gênero *Egeria* Planch, Rodrigues, Dettke e Montanher (2007) reforçaram que essas plantas apresentam folhas com cutícula fina, reduzida a duas camadas celulares, pois não precisam evitar ressecamento e não necessitam proteção à radiação solar por estarem submersas. Outra característica relevante é o caule ocupado em grande proporção por aerênquimas, formando canais de ar que permitem a flutuabilidade da planta, essencial na busca da radiação solar e na propagação vegetativa. Além disso, esta é uma planta com porcentagem baixa de fibra bruta, em torno de 17 e 20% de fibras na massa seca (CORRÊA; VELINI; ARRUDA, 2003).

Desta forma, foi esperada CE alta devido à decomposição de *E. najas* desde o início do processo. Gimenez (2011) obteve valor máximo de  $2.650 \mu\text{s cm}^{-1}$  em câmaras de decomposição anaeróbia de *E. najas*, enquanto que, em condições similares, para *Cyperus giganteus* e *Eichhornia azurea*, recursos vegetais com maior composição de tecidos rígidos, a CE máxima obtida foi de 777 e  $1.097 \mu\text{s cm}^{-1}$ , respectivamente, considerando temperatura de incubação de  $27,8 \text{ }^\circ\text{C}$ , maior do que a aplicada para este trabalho.

#### **4.2.3 Variações de NT**

Os dados de nitrogênio total obtidos na fração dissolvida estão apresentados na Figura 2.12. O valor de NT da amostra inicial coletada na represa, antes da montagem dos experimentos, foi de  $0,19 \text{ mg L}^{-1}$ . Houve diferença significativa ( $p = 0,0002$ ) entre os valores obtidos para as duas condições experimentais. Para a decomposição aeróbia, não houve diferença entre os tratamentos. Na decomposição anaeróbia, os Tratamentos 1 e 3 foram semelhantes entre si, mas diferentes em relação aos Tratamentos 2 e 4, ambos com adição de OTC, também semelhantes entre si.

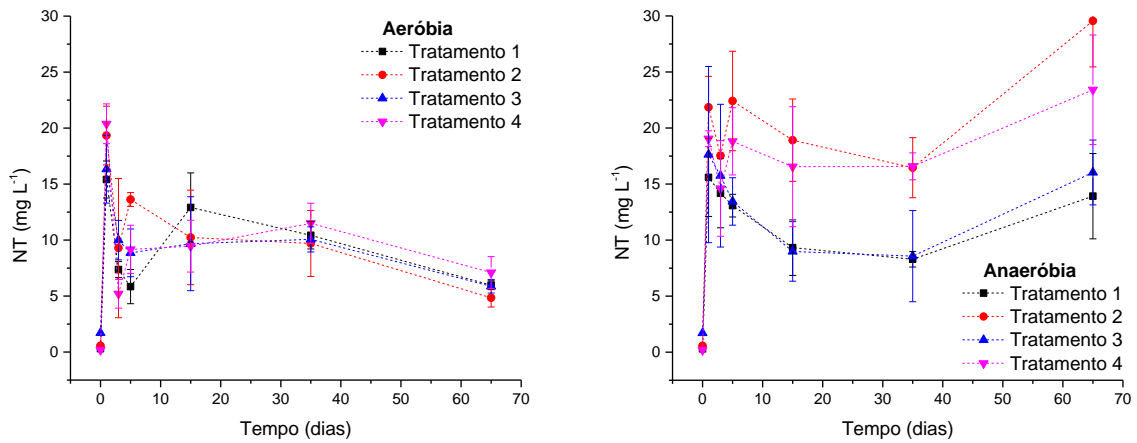


Figura 2.12 – Variação de nitrogênio total dissolvido ao longo do tempo para os bioensaios de decomposição aeróbia e decomposição anaeróbia. Tratamento 1 = Controle, Tratamento 2 = Adição de OTC, Tratamento 3 = Adição de IMZ, Tratamento 4 = Adição de mistura de OTC e IMZ.

Os valores de NT na decomposição anaeróbia oscilaram até o décimo quinto dia de experimento. A partir desse tempo, foi observada a estabilização e decréscimo dos valores absolutos de NT. As variações de NT, em mg L<sup>-1</sup>, do início ao fim do experimento foram de 12,33 (± 1,32) a 4,78 (± 0,32) no Tratamento 1; 15,47 (± 2,10) a 3,88 (0,66) no tratamento 2; 13,06 (± 2,42) a 4,70 (± 0,48) no Tratamento 3; 16,31 (± 1,42) a 5,68 (± 1,13) no Tratamento 4.

Para a decomposição anaeróbia, também foi observada a oscilação dos valores de NT até o décimo quinto dia, mas do trigésimo quinto ao sexagésimo quinto dia houve aumento para todos os tratamentos. Os valores médios de NT, em mg L<sup>-1</sup>, no início e final do experimento foram 12,47 (± 2,78) e 11,14 (± 3,04) para o Tratamento 1; 17,48 (± 2,21) e 23,64 (± 3,28) para o Tratamento 2; 14,11 9 (± 6,29) e 12,83 (± 2,31) para o Tratamento 3; 15,24 (± 0,56) e 18,73 (± 3,91) para o Tratamento 4.

Os nutrientes liberados no processo de lixiviação dos detritos vegetais são principalmente potássio, sódio, magnésio, fósforo e o nitrogênio, sendo este lixiviado em uma quantidade menor se comparados com os processados durante a ação microbiana (PARK; CHO, 2003). Desta forma, os valores de NT foram crescentes logo no início do experimento para ambas as condições, mas, em anaerobiose, observou-se pico de NT no último dia de amostragem, o que indicou atividade microbiana intensa nessa condição no médio prazo, se comparada com a condição de aeração. Isso pode ser representado inclusive pelo aumento da densidade microbiana nos últimos tempos amostrais, nas câmaras de decomposição anaeróbia, que será apresentada adiante no item 4.3.

#### 4.2.4 Balanço de Carbono

Em relação ao COP remanescente, para todos os tratamentos das duas condições experimentais, observou-se perda intensa logo nos primeiros dias de decomposição. Estatisticamente, não foi observada diferença para perda de COP entre os tratamentos ( $p > 0,99$ ) e entre as condições experimentais ( $p = 0,9304$ ). A porcentagem de perda de COP no final da decomposição aeróbia foram 65,02 ( $\pm 2,25$ ) no Tratamento 1; 55,40 ( $\pm 5,39$ ) no Tratamento 2; 61,14 ( $\pm 5,36$ ) no Tratamento 3; 62,61 ( $\pm 1,30$ ) no Tratamento 4. Embora não se tenha verificado diferença significativa para os valores de perda de COP entre os tratamentos, a maior perda ocorreu no Tratamento 1, sem adição de antimicrobianos. Na decomposição anaeróbia, esses valores foram de 68,15 ( $\pm 9,05$ ) no Tratamento 1; 66,55 ( $\pm 3,77$ ) no Tratamento 2; 66,21 ( $\pm 5,99$ ) no Tratamento 3; 69,88 ( $\pm 4,35$ ) no Tratamento 4.

Para os valores de COD foi observada diferença significativa ( $p = 0,0002$ ) entre as condições experimentais, mas não entre os tratamentos. A máxima porcentagem de COD na decomposição aeróbia ocorreu no primeiro dia de amostragem com tendência a diminuição ao longo de 65 dias, os valores máximos encontrados foram de 4,16 ( $\pm 0,38$ ) no Tratamento 1; 4,64 ( $\pm 0,46$ ) no Tratamento 2; 4,08 ( $\pm 0,24$ ) no Tratamento 3; 4,84 ( $\pm 0,16$ ) no Tratamento 4. Na decomposição anaeróbia a tendência do COD foi de aumento até o final dos bioensaios, os valores para o tempo de amostragem 65 dias foram de 8,93 ( $\pm 0,56$ ) no Tratamento 1; 8,43 ( $\pm 2,37$ ) no Tratamento 2; 9,95 ( $\pm 0,24$ ) no Tratamento 3; 10,13 ( $\pm 0,71$ ) no Tratamento 4.

Em relação às porcentagens de CM, não foram observadas diferenças entre os tratamentos ( $p > 0,90$ ) e condições experimentais ( $p = 0,1285$ ). As porcentagens de CM na condição aeróbia após 65 dias foram 64,60 ( $\pm 2,13$ ) no Tratamento 1; 55,08 ( $\pm 5,37$ ) no Tratamento 2; 60,72 ( $\pm 5,40$ ) no Tratamento 3; 62,21 ( $\pm 1,26$ ). Na condição anaeróbia, os valores percentuais de CM no último dia amostral foram 59,22 ( $\pm 9,51$ ) no Tratamento 1; 58,12 ( $\pm 1,62$ ) no Tratamento 2; 56,26 ( $\pm 6,15$ ) no Tratamento 3; 59,75 ( $\pm 4,58$ ) no Tratamento 4.

As variações de COP, COD e CM ao longo do tempo para cada tratamento e condição experimental (aeróbia e anaeróbia) estão apresentadas na Figura 2.13.

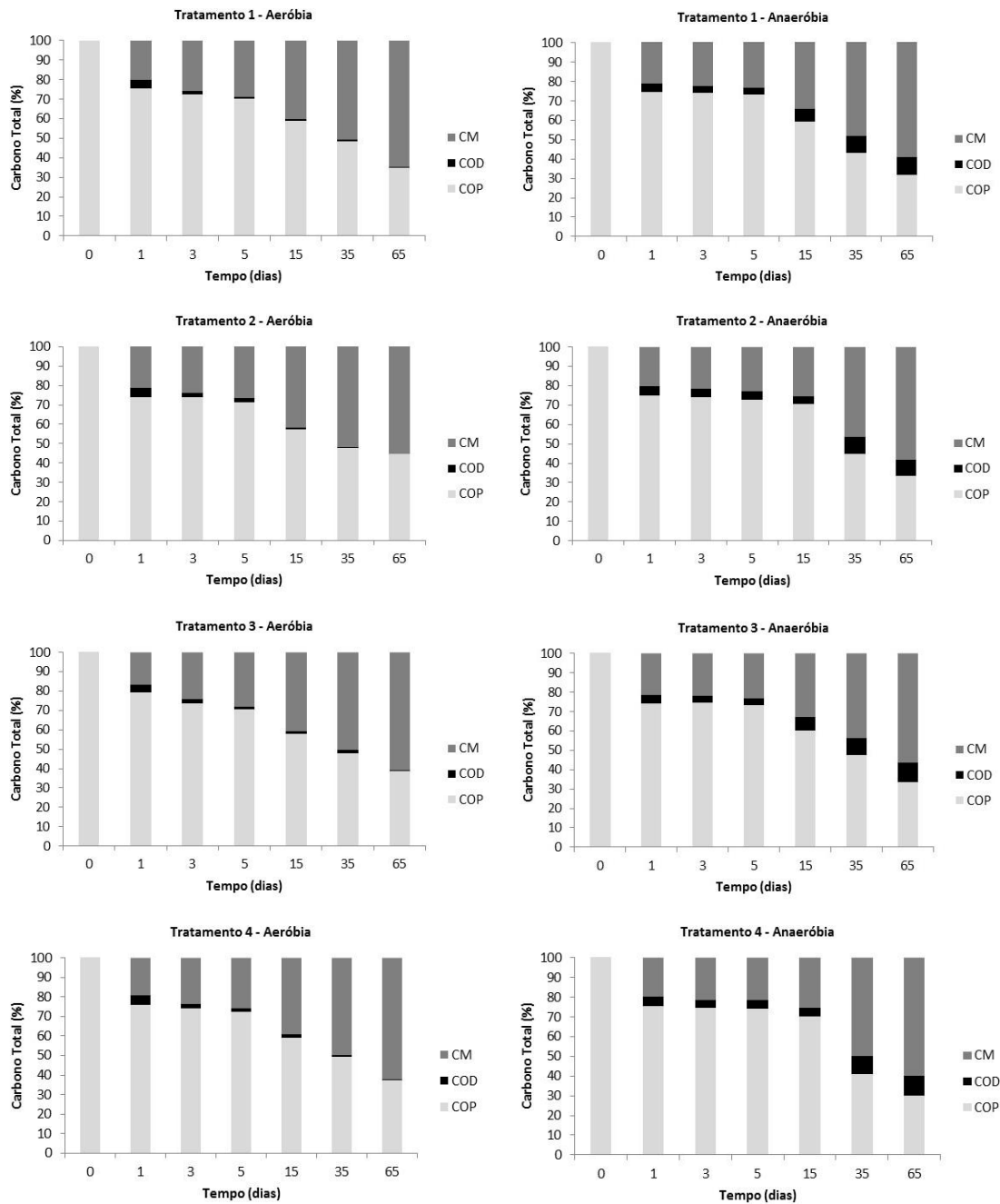


Figura 2.13 – Variações temporais de carbono em porcentagem para carbono orgânico particulado (COP), carbono orgânico dissolvido (COD) e carbono mineralizado (CM), para os bioensaios de decomposição aeróbia e decomposição anaeróbia. Tratamento 1 = Controle, Tratamento 2 = Adição de OTC, Tratamento 3 = Adição de IMZ, Tratamento 4 = Adição de mistura de OTC e IMZ.

As parametrizações do modelo cinético ajustado para as análises de decomposição de *E. najas* estão apresentadas na Tabela 2.6, para a decomposição aeróbia, e na Tabela 2.7, para a decomposição anaeróbia.

Tabela 2.6 – Parametrização do modelo cinético de decomposição aeróbia de *E. najas*. Em que: COP<sub>LS</sub> = carbono orgânico particulado lábil/solúvel, k<sub>LS</sub> = coeficiente de decaimento do COP<sub>LS</sub>, k<sub>1</sub> = coeficiente de mineralização das frações lábeis, COP<sub>R</sub> = carbono orgânico particulado refratário, k<sub>R</sub> = coeficiente de mineralização do COP<sub>R</sub>, COD = carbono orgânico dissolvido, k<sub>2</sub> = coeficiente de lixiviação (referente à taxa de formação do COD), k<sub>3</sub> = coeficiente de mineralização do COD, CM<sub>1</sub> = carbono mineralizado através da oxidação direta (rota 1); CM<sub>2</sub> = carbono mineralizado através da oxidação dos solubilizados (rota 2); CM<sub>3</sub> = carbono mineralizado através da oxidação da fração refratária (rota 3), t<sub>1/2</sub> = tempo de meia-vida; r<sup>2</sup> = coeficiente de ajuste do modelo. Tratamento 1 = Controle, Tratamento 2 = Adição de OTC, Tratamento 3 = Adição de IMZ, Tratamento 4 = Adição de mistura de OTC e IMZ.

Parâmetro	Tratamento			
	1	2	3	4
<b>COP<sub>LS</sub> (%)</b>	26,22 ± 2,33	27,62 ± 6,95	27,20 ± 4,40	25,04 ± 3,57
<b>k<sub>LS</sub> (dia<sup>-1</sup>)</b>	2,31 ± 0,87	2,49 ± 0,99	1,19 ± 0,52	2,55 ± 1,07
<b>t<sub>1/2LS</sub> (dia)</b>	0,30	0,28	0,58	0,27
<b>k<sub>1</sub></b>	1,57	1,20	0,87	1,95
<b>t<sub>1/2</sub> (dia)</b>	0,44	0,35	0,80	0,36
<b>COP<sub>R</sub> (%)</b>	73,78 ± 1,40	72,38 ± 4,09	72,63 ± 2,86	74,96 ± 2,13
<b>k<sub>R</sub> (dia<sup>-1</sup>)</b>	0,012 ± 0,0008	0,009 ± 0,0023	0,011 ± 0,0015	0,011 ± 0,0012
<b>t<sub>1/2R</sub> (dia)</b>	58,05	75,51	64,9	63,01
<b>r<sup>2</sup></b>	0,99	0,91	0,97	0,98
<b>COD (%)</b>	6,36 ± 1,25	5,51 ± 0,97	7,40 ± 2,23	5,98 ± 1,31
<b>k<sub>2</sub></b>	0,73	0,50	0,33	0,6
<b>t<sub>1/2</sub> (dia)</b>	0,94	1,39	2,13	1,14
<b>k<sub>3</sub></b>	0,50 ± 0,15	0,24 ± 0,08	0,48 ± 0,20	0,26 ± 0,11
<b>t<sub>1/2COD</sub> (dia)</b>	1,38	2,89	1,44	2,67
<b>r<sup>2</sup></b>	0,82	0,85	0,56	0,75
<b>CM<sub>1</sub> (%)</b>	19,86	22,10	19,80	19,06
<b>CM<sub>2</sub> (%)</b>	6,36	5,51	7,4	5,98
<b>CM<sub>3</sub> (%)</b>	73,78	72,38	72,63	74,96

Tabela 2.7 – Parametrização do modelo cinético de decomposição anaeróbia de *E. najas*. Em que: COP<sub>LS</sub> = carbono orgânico particulado lábil/solúvel, k<sub>LS</sub> = coeficiente de decaimento do COP<sub>LS</sub>, k<sub>1</sub> = coeficiente de mineralização das frações lábeis, COP<sub>R</sub> = carbono orgânico particulado refratário, k<sub>R</sub> = coeficiente de mineralização do COP<sub>R</sub>, COD = carbono orgânico dissolvido, k<sub>2</sub> = coeficiente de lixiviação (referente à taxa de formação do COD), k<sub>3</sub> = coeficiente de mineralização do COD, CM<sub>1</sub> = carbono mineralizado através da oxidação direta (rota 1); CM<sub>2</sub> = carbono mineralizado através da oxidação dos solubilizados (rota 2); CM<sub>3</sub> = carbono mineralizado através da oxidação da fração refratária (rota 3), t<sub>1/2</sub> = tempo de meia-vida; r<sup>2</sup> = coeficiente de ajuste do modelo. Tratamento 1 = Controle, Tratamento 2 = Adição de OTC, Tratamento 3 = Adição de IMZ, Tratamento 4 = Adição de mistura de OTC e IMZ.

Parâmetro	Tratamento			
	1	2	3	4
<b>COP<sub>LS</sub> (%)</b>	24,07 ± 4,49	22,01 ± 6,39	24,21 ± 4,26	20,41 ± 7,30
<b>k<sub>LS</sub> (dia<sup>-1</sup>)</b>	1,5*	1,5*	1,5*	1,5*
<b>t<sub>1/2LS</sub> (dia)</b>	0,46	0,46	0,46	0,46
<b>k<sub>1</sub></b>	1,11	1,09	1,10	1,03
<b>t<sub>1/2</sub> (dia)</b>	0,62	0,64	0,63	0,67
<b>COP<sub>R</sub> (%)</b>	74,92 ± 2,41	76,75 ± 3,40	74,68 ± 2,27	78,20 ± 3,94,13
<b>k<sub>R</sub> (dia<sup>-1</sup>)</b>	0,014 ± 0,0016	0,013 ± 0,0022	0,013 ± 0,0015	0,015 ± 0,0027
<b>t<sub>1/2R</sub> (dia)</b>	48,95	54,15	55,41	46,21
<b>r<sup>2</sup></b>	0,97	0,94	0,97	0,93
<b>COD (%)</b>	6,20 ± 0,92	6,00 ± 0,82	6,43 ± 1,06	6,43 ± 1,054
<b>k<sub>2</sub></b>	0,39	0,40	0,40	0,47
<b>t<sub>1/2</sub> (dia)</b>	1,79	1,69	1,74	1,47
<b>k<sub>3</sub> (COD)</b>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<b>t<sub>1/2COD</sub> (dia)</b>	∞	∞	∞	∞
<b>r<sup>2</sup></b>	0,55	0,57	0,50	0,48
<b>CM<sub>1</sub> (%)</b>	17,87	16,00	17,78	13,98
<b>CM<sub>2</sub> (%)</b>	∅	∅	∅	∅
<b>CM<sub>3</sub> (%)</b>	74,92	76,75	74,68	78,20

\* valor atribuído para ajuste ao modelo cinético (BITAR, 2003)

Como esperado, o COP<sub>LS</sub> foi a fração do detrito de perda mais rápida (FONSECA et al., 2014), com tempo de meia vida inferior a 24 horas. A variação do tempo de meia vida para essa fração foi de 0,27 a 0,58 dias, para os tratamentos na decomposição aeróbia. Os coeficientes de decaimento do COP<sub>LS</sub> para os tratamentos na decomposição anaeróbia foram atribuídos para melhor ajuste ao modelo, de acordo com Bitar (2003), gerando um tempo de meia vida global da fração lábil/ solúvel de 0,46 dias para todos os tratamentos.



A etapa de formação do  $COP_{LS}$  é independente da comunidade microbiana associada à decomposição. Ela ocorre devido a lixiviação e solubilização de compostos hidrossolúveis da fração protoplasmática das células vegetais. A lixiviação no processo de decomposição depende de fatores intrínsecos dos detritos, referentes à composição química, e das condições ambientais como a temperatura e potencial oxi-redutor do ambiente (SILVA et al., 2011). Neste trabalho, as condições foram padronizadas e por isso não eram esperadas diferenças nas ordens de grandeza dos coeficientes de decaimento e tempos de meia vida para essas frações, entre os tratamentos. As pequenas diferenças observadas se devem às alterações relacionadas à qualidade dos detritos e não aos fatores abióticos como temperatura e potencial oxi-redutor, para cada umas das condições experimentais.

As frações médias de  $COP_{LS}$  obtidas a partir da parametrização da decomposição de *E. najas* indicam que a lixiviação dos detritos foi facilitada pela manutenção da aeração do sistema. Na decomposição aeróbia, a média da fração do  $COP_{LS}$  esteve entre 25,04 e 27,62%. Para a decomposição na condição anaeróbia essa média esteve entre 20,41 a 24,21%. As porcentagens obtidas para essa fração foram condizentes com as encontradas por Bitar (2003). Naquele trabalho, o mesmo modelo cinético adotado na avaliação de mineralização de *E. najas* apontou para frações entre 25,5 e 69,9% de  $COP_{LS}$  nos processos de decomposição anaeróbia, sendo o menor valor obtido para decomposição à temperatura de 20,3 °C.

Os dados referentes à mineralização do COD mostram que essa rota foi priorizada na decomposição aeróbia. Os tempos de meia vida do COD nessa condição foram maiores nos tratamentos que continham OTC no sistema. Assim, o tempo de meia vida para o Tratamento 1, controle sem adição de compostos antimicrobianos, foi de 1,38 dias. Para os Tratamentos 2 e 4, com OTC, os tempos de meia vida do COD foram de 2,89 e 2,67 dias respectivamente. No Tratamento 3, somente com IMZ, o tempo de meia vida foi de 1,44 dias.

Na decomposição anaeróbia, a fração de COD tende ao acúmulo. Isso indica que a formação do COD por lixiviação e hidrólise enzimática é maior que imobilização por parte da microbiota envolvida no processo, e no tempo determinado para o estudo. Essa tendência pode ser observada na Figura 2.13.

Como esperado, a fração do CO de decomposição mais lenta foi a refratária. A porcentagem dessa fração nos fragmentos em decomposição aeróbia variou entre 72,38 a 74,96%. Foi observada diferença na ordem de grandeza do coeficiente de mineralização

COP<sub>R</sub> sob efeito de OTC, o que resultou no aumento de cerca de 18 dias no tempo de meia vida sob efeito do antibiótico no Tratamento 2 (75,5 dias). Ou seja, o tempo de meia vida para esse tratamento foi 1,3 vezes superior se comparada ao controle sem adição de OTC (58,05 dias). Para os outros tratamentos com adição de antimicrobianos, também foi observado o aumento do tempo de meia vida do COP<sub>R</sub> que foi calculado em 64,9 dias para o Tratamento 3 e 63,01 dias para o Tratamento 4.

Ao contrário do esperado, na decomposição anaeróbia, a mineralização do COP<sub>R</sub> foi mais rápida do que na condição aeróbia. Os tempos de meia-vida para os experimentos dessa condição foram de 46,21 a 48,95 dias. Neste caso, não foi observada uma tendência de diminuição ou aumento do tempo de meia vida entre os tratamentos com adição de antimicrobianos.

Para as duas condições experimentais, as constantes de decaimento ( $k_R$ ) do COP<sub>R</sub> (Tabelas 2.6 e 2.7) indicam que a mineralização da fração refratária dos detritos de *E. najas* pode ser classificada segundo Petersen e Cummins (1974) como um processo rápido para as duas condições e todos os tratamentos, exceto para o Tratamento 2, da condição aeróbia. De acordo com essa categorização dos coeficientes de decaimento pode ser definida nos intervalos: lento ( $k = 0$  a  $0,005 \text{ dia}^{-1}$ ), médio ( $k = 0,005$  a  $0,010 \text{ dia}^{-1}$ ) e rápido ( $k = 0,010 \text{ dia}^{-1}$  ou superior). De acordo com Gimenes, Cunha-Santino e Bianchini Júnior (2013), a constante de decaimento ( $k_R$ ) média dos detritos de *E. najas* é de 0,014. Os valores encontrados na literatura são 0,0018 (GIMENES, CUNHA-SANTINO; BIANCHINI JÚNIOR, 2013), 0,0076 (NUNES, 2010), 0,014 e 0,045 (CARVALHO et al., 2005).

#### **4.3 Diversidade do Domínio Bacteria por análises de PCR/DGGE e densidade bacteriana**

A técnica de extração de ADN da biomassa úmida obtida das amostras de água das câmaras de decomposição dos tempos 1, 15 e 65 dias foi considerada satisfatória. As concentrações de ADN obtidas estiveram entre 143,4 a 1.736,2 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , para os bioensaios aeróbios (Tabela 2.8), e entre 158,8 a 925,5 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  para os bioensaios anaeróbios (Tabela 2.9). A relação expressa pela absorbância da amostra nos comprimentos de onda de 260/280 nm indicou pureza do ADN extraído, estando muito próximos da faixa de valor de referência 1,80 – 2,00 (SAMBROCK; FRITSCHI; MANIATIS, 1989). Os valores encontrados foram entre 1,93 a 2,09 para os tratamentos

na condição aeróbia (Tabela 2.8) e 1,93 a 2,12 para os tratamentos na condição anaeróbia (Tabela 2.9).

Tabela 2.8 – Concentração e pureza do ADN extraído a partir de amostras dos bioensaios de decomposição aeróbia. Tratamento 1 = Controle, Tratamento 2 = Adição de OTC, Tratamento 3 = Adição de IMZ, Tratamento 4 = Adição de mistura de OTC e IMZ.

		Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3	Tratamento 4
Tempo 1 (dias)	Concentração (ng $\mu\text{L}^{-1}$ )	1736,2	844,7	1654,9	1382,3
	Relação 260/280 nm	2,09	2,07	2,08	2,07
Tempo 15 (dias)	Concentração (ng $\mu\text{L}^{-1}$ )	885,1	589,3	709,2	505,4
	Relação 260/280 nm	2,00	1,93	1,98	1,95
Tempo 65 (dias)	Concentração (ng $\mu\text{L}^{-1}$ )	355,4	143,4	214,2	300,7
	Relação 260/280 nm	2,03	1,99	2,02	1,94

Tabela 2.9 – Concentração e pureza do ADN extraído a partir de amostras dos bioensaios de decomposição anaeróbia. Tratamento 1 = Controle, Tratamento 2 = Adição de OTC, Tratamento 3 = Adição de IMZ, Tratamento 4 = Adição de mistura de OTC e IMZ.

		Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3	Tratamento 4
Tempo 1 (dias)	Concentração (ng $\mu\text{L}^{-1}$ )	590,5	810,6	925,5	830,5
	Relação 260/280 nm	2,01	2,09	2,12	2,09
Tempo 15 (dias)	Concentração (ng $\mu\text{L}^{-1}$ )	410,6	440,5	654,9	533,3
	Relação 260/280 nm	1,92	1,93	1,90	1,85
Tempo 65 (dias)	Concentração (ng $\mu\text{L}^{-1}$ )	563,8	152,8	712,4	387,7
	Relação 260/280 nm	1,95	1,93	2,00	1,98

Os índices de diversidade para o Domínio Bacteria não apresentaram variações consideráveis entre os tratamentos e ao longo do tempo de experimento (Tabela 2.10). A diversidade nos tratamentos em aerobiose apresenta uma leve tendência de aumento do início ao final do experimento, mas isso não foi evidente para a condição anaeróbia. Para os bioensaios aeróbios os valores do índice de diversidade estiveram entre 2,62 e 3,18. Nos bioensaios anaeróbios os valores do índice estiveram entre 2,55 e 3,21.

Tabela 2.10 – Índice de diversidade de Shannon-Wiener para o Domínio Bacteria para amostras dos bioensaios de decomposição aeróbia e decomposição anaeróbia. Tratamento 1 = Controle, Tratamento 2 = Adição de OTC, Tratamento 3 = Adição de IMZ, Tratamento 4 = Adição de mistura de OTC e IMZ.

	<b>Aeróbia</b>				<b>Anaeróbia</b>			
	<b>Tratamento 1</b>	<b>Tratamento 2</b>	<b>Tratamento 3</b>	<b>Tratamento 4</b>	<b>Tratamento 1</b>	<b>Tratamento 2</b>	<b>Tratamento 3</b>	<b>Tratamento 4</b>
<b>Tempo 1 (dia)</b>	2,66	2,65	2,68	2,62	3,13	2,86	3,15	2,55
<b>Tempo 15 (dias)</b>	3,00	2,89	3,08	3,08	3,23	3,06	3,21	3,13
<b>Tempo 65 (dias)</b>	3,09	3,16	3,18	2,79	3,09	3,03	3,07	3,12

Mediante a análise de *cluster* do perfil das bandas do DGGE, mudanças nas comunidades microbianas foram observadas para o Domínio Bacteria, ao longo do tempo e entre os tratamentos para as duas condições experimentais.

A análise de agrupamento dos perfis do gel de DGGE (Figuras 2.14 e 2.15), mostrou que, de forma geral, houve maior similaridade dos perfis da comunidade bacteriana para os tratamentos do mesmo tempo de amostragem e menor similaridade entre os tempos de amostragem. Para os tratamentos dos bioensaios aeróbios (Figura 2.14) as porcentagens de similaridade entre o tempo amostral 1 e os tempos 15 e 65 foram de 48 e 42%, respectivamente. Para os tratamentos dos bioensaios aneróbios (Figura 2.15), as porcentagens de similaridade entre o tempo amostral 1 e os tempos 15 e 65 foram de 31%.

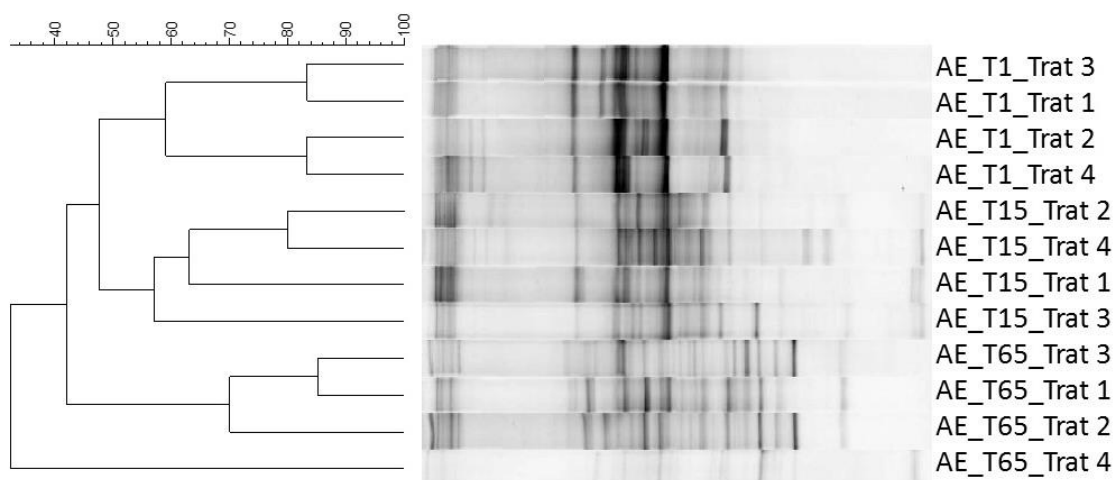


Figura 2.14 – Análise de agrupamento por UPGMA do perfil das bandas de DGGE dos fragmentos de rARN 16S para o Domínio Bacteria de amostras dos bioensaios de decomposição aeróbia. T1 = tempo 1 dia, T15 = tempo 15 dias, T65 = tempo 65 dias. Trat = tratamento. Trat1 = Controle, Trat 2 = Adição de OTC, Trat 3 = Adição de IMZ, Trat 4 = Adição de mistura de OTC e IMZ.

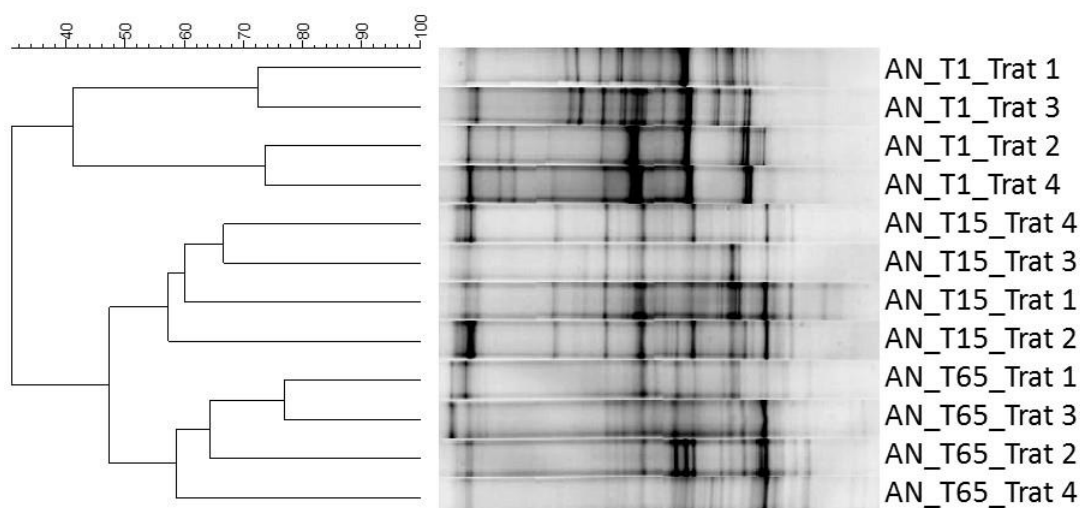


Figura 2.15 – Análise de agrupamento por UPGMA do perfil das bandas de DGGE dos fragmentos de rARN 16S para o Domínio Bacteria de amostras dos bioensaios de decomposição anaeróbia. T1 = tempo 1 dia, T15 = tempo 15 dias, T65 = tempo 65 dias. Trat = tratamento. Trat1 = Controle, Trat 2 = Adição de OTC, Trat 3 = Adição de IMZ, Trat 4 = Adição de mistura de OTC e IMZ.

Nos bioensaios aeróbios, a adição da OTC às câmaras de decomposição parece ter sido um fator importante na estrutura da comunidade bacteriana. Isso pode ser observado logo no primeiro tempo de análise em que os perfis das amostras dos tratamentos 2 e 4, ambos com adição de OTC, apresentaram similaridade de 83%. O mesmo valor de similaridade foi verificado para os perfis das amostras dos tratamentos 1 e 3, ambos sem adição de oxitetraciclina. Entre os dois grupos a similaridade foi de 59% nesse tempo amostral. No tempo amostral de 15 dias, a similaridade entre os tratamentos 2 e 4 foi de 80%, e a similaridade deste grupo em relação às demais amostras não passou de 63%. No

final do experimento, aos 65 dias, os perfis dos tratamentos 1 e 3 apresentaram similaridade de 85%, e o tratamento 2 apresentou 70% de similaridade em relação a este grupo.

Nos bioensaios anaeróbios, o primeiro tempo amostral apresentou o mesmo comportamento descrito anteriormente para os bioensaios aeróbios, no entanto a similaridade entre os agrupamentos foi menor. Os tratamentos 1 e 3, apresentaram similaridade de 72% e os tratamentos 2 e 4, ambos com OTC, apresentaram similaridade de 74%. Os dois grupos foram apenas 41% similares entre si. No tempo 15 dias, a maior similaridade encontrada foi de 67% entre os tratamentos 3 e 4. Já no tempo 65 dias, a maior similaridade verificada foi entre os tratamentos 1 e 3, com 77% de similaridade.

A densidade bacteriana das amostras iniciais, antes do estabelecimento dos bioensaios, foi de  $3,10 \times 10^5 (\pm 0,78 \times 10^5)$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Nos bioensaios aeróbios (Figura 2.16), houve o aumento no número de células nas primeiras 24 horas para todos os tratamentos, tendo sido mais expressivo no Tratamento 1, sem adição de antimicrobianos, com  $4,43 \times 10^6 (\pm 0,82 \times 10^6)$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Em relação ao valor inicial, a densidade bacteriana se manteve maior até o final do experimento, mas foi observada queda em relação aos dados obtidos no tempo 1 dia para todos os tratamentos.

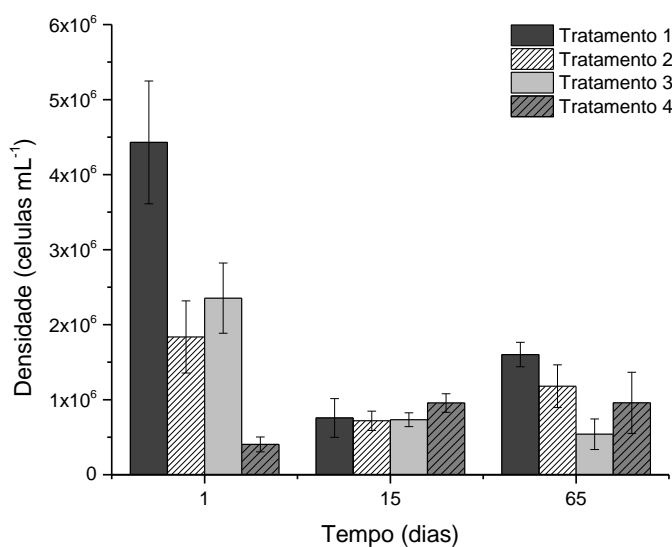


Figura 2.16 – Densidade bacteriana para as amostras dos bioensaios de decomposição aeróbia. Tratamento 1 = Controle, Tratamento 2 = Adição de OTC, Tratamento 3 = Adição de IMZ, Tratamento 4 = Adição de mistura OTC e IMZ.

Para os bioensaios anaeróbios (Figura 2.17), foi observada a queda na densidade após 24 horas em relação à densidade da amostra inicial, para todos os tratamentos.

Assim, no Tratamento 1, a densidade foi de  $2,84 \times 10^5 (\pm 0,11 \times 10^5)$  células  $\text{mL}^{-1}$ , no tempo 1. No entanto, a tendência foi de aumento do número de células ao longo do tempo de experimento para todos os tratamentos, sendo que o Tratamento 1 apresentou densidade máxima de  $3,12 \times 10^6 (\pm 0,81 \times 10^6)$  células  $\text{mL}^{-1}$ , no tempo 65 dias.

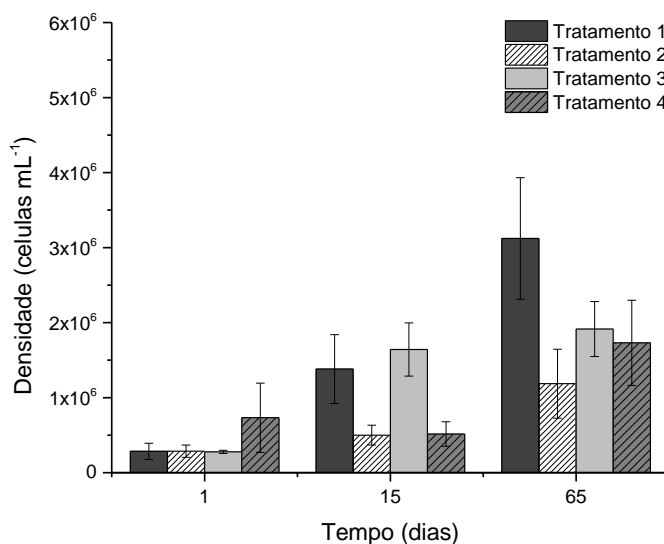


Figura 2.17 – Densidade bacteriana para as amostras dos bioensaios de decomposição anaeróbia. Tratamento 1 = Controle, Tratamento 2 = Adição de OTC, Tratamento 3 = Adição de IMZ, Tratamento 4 = Adição de mistura de OTC e IMZ.

As tendências observadas para os dados de densidade bacteriana foram condizentes com os demais dados obtidos nas análises aplicadas à decomposição de *E. najas*. Sob aeração o metabolismo microbiano é mais acelerado, e a maior disponibilidade de nutrientes lixiviados fez com que a multiplicação celular tenha sido intensa no início do experimento. A rápida liberação de nutrientes pela lixiviação acompanhada pelo subsequente crescimento de bactérias foi relatada também por Vähäälö e Sondergaard (2002). Conforme o processo de mineralização da MO se estabilizou as comunidades microbianas se estabeleceram e se tornaram mais especializadas e competidoras.

No caso dos bioensaios anaeróbios, a queda na densidade bacteriana no início do experimento indicou a mudança nas condições ambientais a que os microrganismos foram submetidos, com queda brusca da disponibilidade de oxigênio dissolvido para as atividades metabólicas. Assim, uma parte da comunidade bacteriana sensível às baixas concentrações de oxigênio dissolvido pode ter morrido logo no início do experimento ou diminuído sua taxa metabólica. O estabelecimento da comunidade microbiana anaeróbia ocorreu após um tempo maior se comparado com a comunidade microbiana aeróbia.

Como o metabolismo microbiano anaeróbio é mais lento do que o metabolismo aeróbio (MADIGAN et al., 2009), o aumento efetivo da densidade de células bacterianas foi observado no último tempo amostral.

Do ponto de vista ecológico, os resultados de densidade celular observados neste trabalho podem ainda ser explicados pela definição de estratégias das comunidades bacterianas. Segundo Andrews e Harris (1986), as comunidades microbianas podem se estabelecer utilizando estratégias r ou K. Essencialmente, r-estrategistas maximizam sua capacidade de sobrevivência em ambientes ricos em nutrientes, apresentando taxas de crescimento específico maiores, porém com menor afinidade ao substrato. Microrganismos K-estrategistas apresentam crescimento mais lento, porém possuem maior afinidade pelo substrato. De Leij, Whipps e Lynch (1994) relatam ainda que os microrganismos K estrategistas apresentam maior capacidade de utilizarem substratos recalcitrantes como lignina e celulose, e eles ainda são menos suscetíveis a compostos tóxicos do que os r-estrategistas. Assim, as populações r-estrategistas provavelmente estiveram mais presentes no início dos bioensaios aeróbios, e a comunidade pode ter mudado sua estratégia ao longo dos experimentos. Ao contrário, nos bioensaios anaeróbios, as populações K-estrategistas podem ter se estabelecido desde o primeiro dia de incubação.



### **Parte III**

---

## **Decaimento de Oxitetraciclina na Presença e Ausência de Detritos de *Egeria najas* Planch**

## 1 Introdução

As investigações sobre a presença de OTC no ambiente se tornaram mais presentes na literatura científica a partir da década de 90 (século XX). Segundo uma importante revisão sobre compostos farmacêuticos residuais no ambiente, realizada por Halling-Sorensen et al. (1998), até o final daquela década sete estudos sobre detecção e quantificação desse composto em matrizes ambientais haviam sido publicados. Nos trabalhos citados por Halling-Sorensen op. cit, a OTC foi encontrada em amostras de sedimentos, nas concentrações de 0,1 a 11  $\mu\text{g g}^{-1}$ , e em um deles o valor encontrado chegou a 285  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

Posteriormente, outros trabalhos buscaram intensificar os estudos sobre a ocorrência e destino da OTC no ambiente. Kolpin et al. (2002) encontraram valores máximos de 0,34  $\mu\text{g L}^{-1}$  do antibiótico em águas superficiais de rios nos Estados Unidos. Calamari et al. (2003) reportaram o valor de 0,19  $\mu\text{g L}^{-1}$  em águas superficiais de rios no norte da Itália. Kim e Carlson (2007), também em estudo em rios nos Estados Unidos, encontraram valores de 1,21  $\mu\text{g L}^{-1}$  em amostras de água superficial. Em estudo exploratório sobre a ocorrência de OTC em amostras de água superficial e sedimentos de um rio na Coreia do Sul, Awad et al. (2014) encontraram, com frequência de até 73% e 60%, valores máximos de 0,32  $\mu\text{g L}^{-1}$  em amostras de água e 1,43  $\mu\text{g g}^{-1}$  em amostras de sedimentos. Na China, a OTC foi detectada com valor máximo de 0,49  $\mu\text{g L}^{-1}$  em amostras de água de um lago (TANG et al. 2015).

Alguns trabalhos dão maior atenção à presença de OTC em efluentes de estações de tratamento de esgoto, reforçando estes como uma importante fonte de contaminação para o ambiente aquático. Estudos sob esse enfoque podem ser citados, como os de Gagné, Blaise e André (2006) e Tang et al. (2015). Não foram encontrados estudos referentes à ocorrência de OTC no Brasil.

Dado o histórico de estudos sobre ocorrência de OTC em matrizes ambientais, é cada vez mais necessário que seja avaliado o destino e persistência desse composto no ambiente. Do ponto de vista ecológico, a partir da compreensão sobre as rotas da OTC, podem ser previstas a disponibilidade do antimicrobiano aos organismos não alvo e riscos associados à presença desse composto no ambiente. Ao ser introduzido no ambiente, por meio das mais diversas fontes, a molécula de OTC pode sofrer uma série de transformações e interações que irão definir sua estabilidade e permanência nas diferentes matrizes ambientais.

Quando disposto no solo ou sedimentos, o composto pode sofrer os processos de adsorção ao material orgânico. A adsorção depende, em grande parte, das características físicas e químicas do solo, como tamanho de grão, pH do meio, teor de carbono orgânico e presença e estrutura das substâncias húmicas (THIELE-BRUHN, 2003; FIGUEROA; LEONARD; MACKAY, 2004; KULSHRESTHA; GIESE; AGA, 2004; THIELE-BRUHN; BECK 2005; PAROLO et al., 2008; AVISAR et al., 2010). Tolls (2001) revisou os valores de coeficientes de adsorção ao carbono orgânico (*K<sub>oc</sub>*) e encontrou uma faixa ampla variando de 17 L kg<sup>-1</sup> na fração arenosa de sedimentos marinhos a 93.300 L kg<sup>-1</sup> em solo arenoso. Em meio aquoso, as moléculas de OTC podem sofrer adsorção ao material particulado em suspensão e hidrólise dependendo das condições físicas e químicas da água (POULIQUEN; LE BRIS; PINAULT, 1993; POULIQUEN et al. 2007; XUAN et al. 2010; ESPINOZA et al. 2014).

## 2 Objetivos

Frente às considerações expostas anteriormente e considerando o estudo apresentado na Parte II, os objetivos deste trabalho foram:

- ✓ Determinar um método para análise de OTC em água por extração em fase sólida, e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos;
- ✓ Avaliar o decaimento de OTC em água em condições de aerobiose e anaerobiose;
- ✓ Avaliar o decaimento de OTC em água na presença e na ausência de detritos da macrófita aquática *E. najas*.

### 3 Materiais e métodos

A avaliação do decaimento de OTC, na presença e ausência de detritos de material vegetal, foi realizada paralelamente aos bioensaios de decomposição de *E. najas* apresentados no Parte II desta tese. O método para detecção e quantificação de OTC nas amostras de água obtidas durante o experimento foi desenvolvido utilizando extração em fase sólida (EFS) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por arranjo de diodos (DAD).

#### 3.1 Padrões e reagentes

O padrão cloridrato de oxitetraciclina ( $C_{22}H_{24}N_2O_9$  HCl - *Oxytetracyclin hydrochloride* VETRANAL/ Fluka, pureza = 97%) utilizado nos experimentos e no desenvolvimento do método analítico foi obtido da empresa Sigma-Aldrich Co (Steinheim, Alemanha). A solução estoque de  $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ , para desenvolvimento do método analítico, foi preparada em metanol grau HPLC (MeOH, 99,9%), J.T. Baker (Xalostoc, México). Esta foi armazenada em frascos de vidro âmbar, protegida da luz, sob refrigeração a  $4^\circ\text{C}$ .

O padrão analítico imazalil ( $C_{14}H_{14}C_{12}N_2O$  - Imazalil PESTANAL/ Fluka, pureza = 99,7%) utilizado para desenvolvimento dos experimentos foi também obtido da empresa Sigma-Aldrich Co (Steinheim, Alemanha).

Os demais reagentes utilizados – ácido clorídrico (HCl, 37%), ácido fórmico (HCOOH, 85%), ácido etilenodiamino tetra-acético dissódico ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ), acetato de sódio anidro ( $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ ) e cloreto de cálcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) possuíam padrão analítico (PA) da marca Synth (Diadema, Brasil). A água ultrapura utilizada no estudo foi obtida no sistema Milli-Q (Millipore).

#### 3.2 Método de análise e extração de OTC em água

##### 3.2.1 Análises em CLAE-DAD

As análises em CLAE foram realizadas usando o equipamento Shimadzu LC - 10 AD VP com bomba binária, acoplado ao detector de arranjo de diodos Shimadzu SPD - M10A VP, monitorado em 380 nm. A separação foi feita pela coluna Zorbax SB C-18

(250 mm x 4.6 mm d.i., 5 µm) com pré-coluna Agilent HC-C18 (12.5 mm x 4.6 mm d.i.), a temperatura ambiente. O volume de injeção foi de 20 µL e a fase móvel foi composta por tampão de NaC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (0,375 mol L<sup>-1</sup>), CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,0175 mol L<sup>-1</sup>) e Na<sub>2</sub>EDTA (0,0125 mol L<sup>-1</sup>) a pH 7,0 (MAMANI; REYES; RATH, 2009), como fase aquosa. A fase orgânica foi composta por metanol. A proporção das fases aquosa e orgânica foi de 60:40 (v v<sup>-1</sup>), respectivamente, em fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>.

A curva analítica foi preparada em triplicata, no mesmo tampão descrito acima, na faixa de 0,5 a 200 µg mL<sup>-1</sup>. A linearidade foi determinada a partir da relação matemática entre o sinal medido por cromatografia e a concentração da OTC. Assim foi obtida a curva analítica pela equação de reta do tipo  $y = ax + b$ . Os coeficientes  $a$  e  $b$  da curva analítica foram estimados a partir do conjunto de medições experimentais usando a regressão linear. Para estimativa da qualidade da curva obtida, foi definido o coeficiente de determinação ( $r^2$ ), considerando que quanto mais próximo de 1, menor é a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (BARROS NETO; PIMENTEL; ARAÚJO, 2002; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). Foram adotados como satisfatórios valores de  $r^2$  acima de 0,90 (INMETRO, 2003).

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados empregando-se o método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI et al., 2004). O limite de detecção (LD) foi expresso seguindo a Equação 3.1 e o limite de quantificação (LQ) foi obtido pela Equação 3.2.

$$LD = 3,3 \times S/a \dots \dots \dots \text{Equação 3.1}$$

$$LQ = 10 \times S/a \dots \dots \dots \text{Equação 3.2}$$

em que:  $S$ = estimativa do desvio padrão da resposta (determinado pela estimativa do desvio-padrão do coeficiente linear da equação da reta);  $a$ = coeficiente angular da curva analítica.

### 3.2.2 Preparo das amostras e extração de OTC em água

O método de extração de OTC na matriz água foi determinado a partir de experimentos piloto, preparados sem adição do composto OTC. A partir desses experimentos, foi possível obter água com as características de interesse, ou seja, em condições similares ao experimento final. O desenvolvimento do método de extração e análise de OTC seguiu modificações dos métodos descritos por Babić et al. (2006) e Granados et al. (2005), descritas a seguir.

Amostras de indivíduos adultos de *E. najas* foram coletadas manualmente na represa do Beija-Flor e levadas ao laboratório onde foram lavadas e secas em estufa a 45 °C. Com essas amostras de planta foram montadas incubações em frascos de vidro (830 mL) contendo fragmentos da planta e água da represa do Beija-Flor na proporção de 10 g L<sup>-1</sup>. Após 20 dias de incubação, amostras de água dos experimentos piloto foram filtradas em membrana de acetato de celulose, diâmetro de 47 mm e poro de 0,45 µm (Whatman), e enriquecidas com OTC em concentrações que variaram de 0,25 a 2,5 µg mL<sup>-1</sup>.

Segundo método estabelecido, foram adicionados 0,02 mol L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>EDTA nas amostras e estas tiveram o pH ajustado para 3,4 com ácido fórmico (5%). A extração (Figura 3.1) foi feita em cartuchos de polímero de estireno divinilbenzeno com superfície modificada, Strata-X (200 mg, 3 mL), condicionados com 5 mL de metanol e 5 mL de água ultrapura em pH 4,0. Em sequência à etapa de condicionamento, alíquotas de 100 mL das amostras tratadas foram passadas pelos cartuchos. Os mesmos foram lavados com 2 mL de metanol a 2% e secos sob vácuo por 5 minutos. A eluição foi feita com 10 mL de metanol. Os extratos obtidos foram secos com ar comprimido e reconstituídos para 1 mL em tampão descrito, no item 3.2.1.

O método foi realizado em triplicata para cada uma das concentrações testadas (RIBANI et al., 2004). Para medidas de recuperação do composto, foram feitas extrações de amostras sem adição de OTC (branco) que foram fortificadas na etapa de reconstituição do extrato. O fator de recuperação em porcentagem foi calculado a partir da razão, multiplicada por 100, das médias obtidas para as concentrações das amostras fortificadas antes da extração, pelas médias das concentrações das amostras fortificadas após a extração. Como forma de avaliar o efeito da matriz de interesse, os mesmos procedimentos foram realizados utilizando água ultrapura enriquecida com OTC (BRITO et al. 2003).

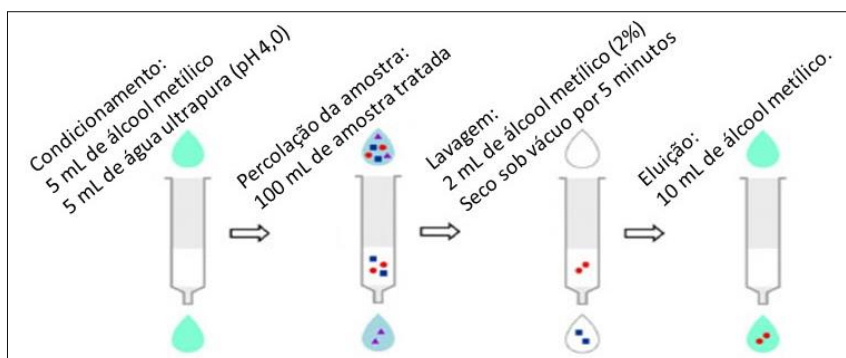


Figura 3.1 – Etapas da EFS do composto OTC em amostras de água.

### 3.3 Delineamento experimental: decaimento de oxitetraciclina na presença e ausência de detritos de macrófita *Egeria najas* Planch

Os experimentos para avaliação do decaimento de OTC foram estabelecidos em câmaras de decomposição contendo fragmentos de macrófita *E. najas* e água coletada na Represa do Beija-Flor, sob condições de aerobiose e anaerobiose, adicionada de OTC e mistura de OTC e IMZ (seção 3, Parte II). Paralelamente, para que fosse acompanhado o decaimento de OTC em água, foram montados experimentos nas mesmas condições dos anteriormente citados sem a adição dos detritos de macrófita. Outras incubações foram montadas sem adição dos detritos de macrófita e sem OTC e IMZ, como controle do processo.

As amostras de água para os experimentos foram coletadas na Represa do Beija-Flor, no ponto II, localizado sobre o banco de macrófitas (seção 3, Parte II). A água utilizada nos experimentos foi filtrada em malha de náilon (poro de aproximadamente 400  $\mu\text{m}$ ) para retirada de partículas grosseiras. As câmaras de decomposição foram cobertas com material plástico preto para evitar a entrada de luz e assim inibir reações de fotólise. O experimento foi conduzido em sala escura a 21  $^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 0,91$   $^{\circ}\text{C}$ ). Os tempos de amostragem foram: 1, 3, 5, 15, 35 e 65 dias após o estabelecimento dos experimentos.

Para cada uma das condições, ou seja, aeróbia e anaeróbia, foram estabelecidos quatro tratamentos, nomeados respeitando a sequência da numeração estabelecida na seção 3 da Parte II:

- ✓ Tratamento 2: detritos de macrófita e água adicionada de OTC – 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ;
- ✓ Tratamento 4: detritos de macrófita e água adicionada de mistura de OTC e IMZ – respectivamente 2 e 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ;



- ✓ Tratamento 5: água adicionada de OTC – 2 µg mL<sup>-1</sup>;
- ✓ Tratamento 6: água adicionada de mistura de OTC e IMZ – respectivamente 2 e 4 µg mL<sup>-1</sup>;
- ✓ Tratamento 7: controle – apenas água sem adição de interferentes.

Em cada tempo amostral, foram determinados o pH, com pH-metro Qualxtron modelo 8010, e a condutividade elétrica (CE), com condutivímetro Digimed modelo DM3. As câmaras foram submetidas por 3 minutos ao ultrassom Ultra Turrax IKA modelo T10, para homogeneização das amostras. O conteúdo das câmaras foi pré-filtrado em malha de náilon (poro de aproximadamente 400 µm) e posteriormente em membrana de acetato de celulose, diâmetro de 47 mm e poro de 0,45 µm (Whatman), para análise de COD e OTC. Esquemáticamente, o delineamento experimental está descrito na Figura 3.2.

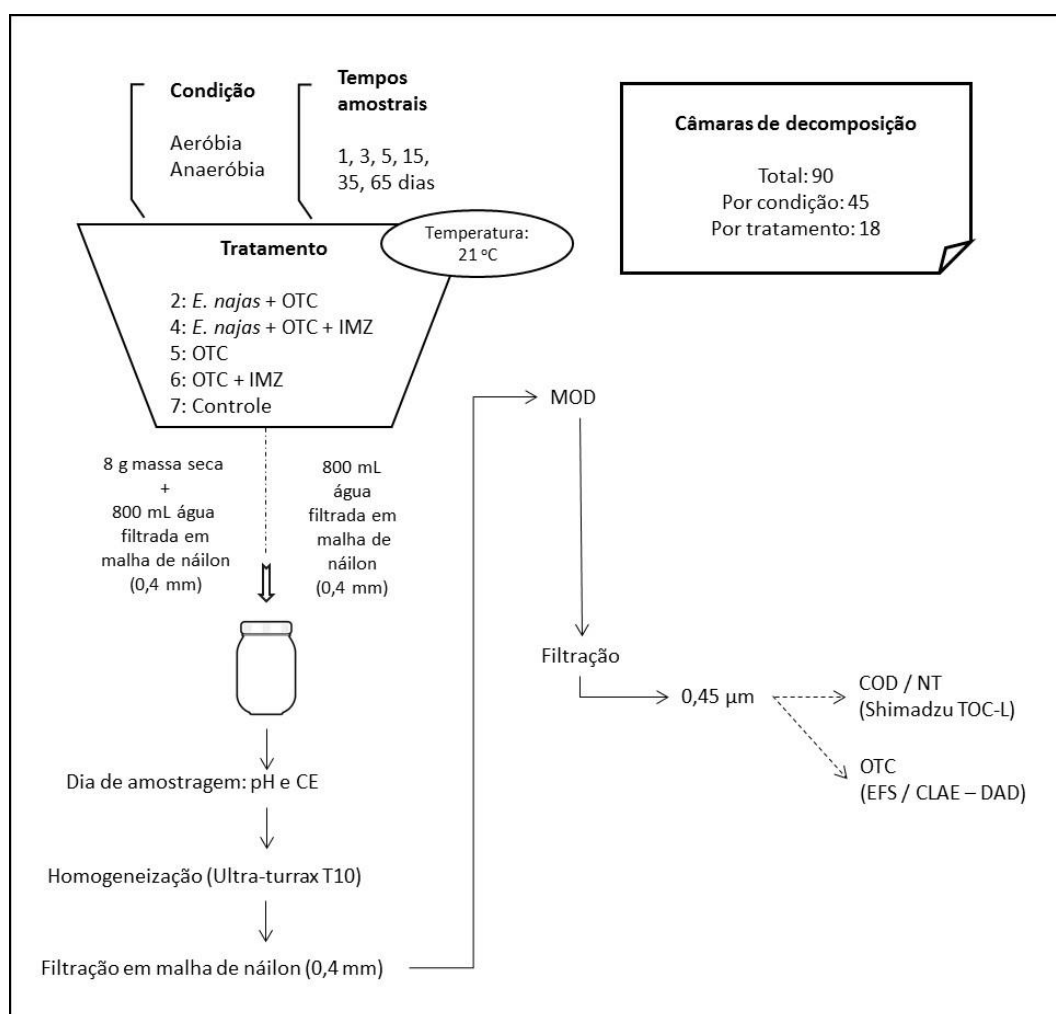


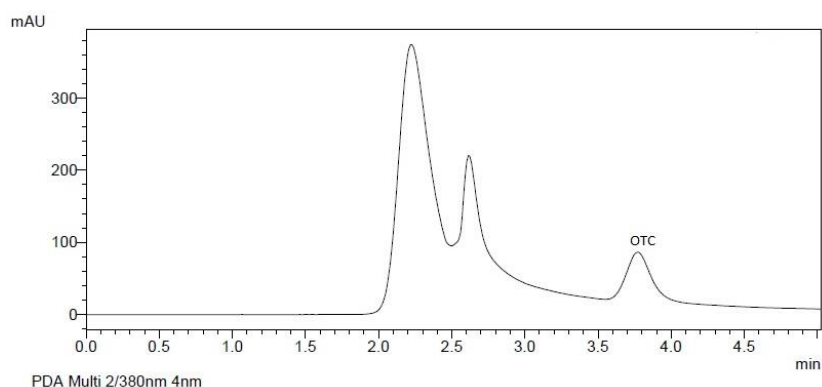
Figura 3.2 – Resumo esquemático dos tratamentos do experimento de decaimento de OTC e análises realizadas em cada tempo amostral.

## 4 Resultados e discussão

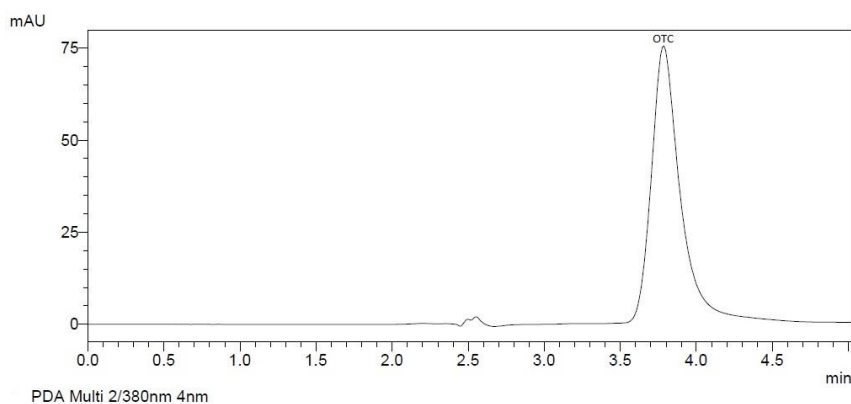
### 4.1 Método EFS-CLAE-DAD

O método para análise de OTC em CLAE-DAD foi considerado satisfatório para o objetivo proposto. O tempo de análise de OTC foi de 5 minutos, sendo o tempo de retenção do composto de 3,7 minutos. O método analítico desenvolvido apresentou desvio-padrão relativo médio de 0,46 %. A curva analítica em CLAE-DAD apresentou boa linearidade ( $r^2 > 0,99$ ), com LD de  $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$  e LQ de  $0,04 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

O método de EFS também foi satisfatório, com recuperação média de 87,0% para testes com a matriz de interesse. Nos testes com água ultrapura a recuperação média foi 93,8%, maior do que a citada anteriormente. No entanto, as curvas apresentaram excelente correlação positiva, com  $r$  de 0,99 ( $p < 0,05$ ), evidenciando o baixo efeito da matriz no método de extração. Exemplos dos cromatogramas obtidos estão apresentados nas Figuras 3.3; 3.4; 3.5.

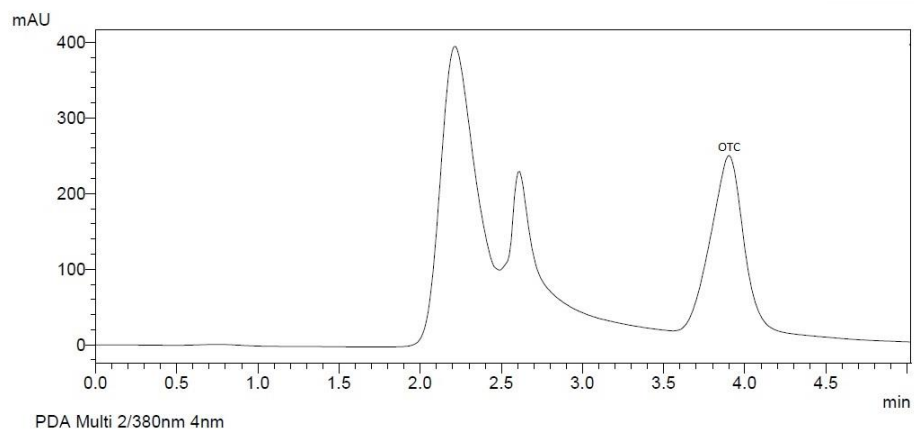


(a)

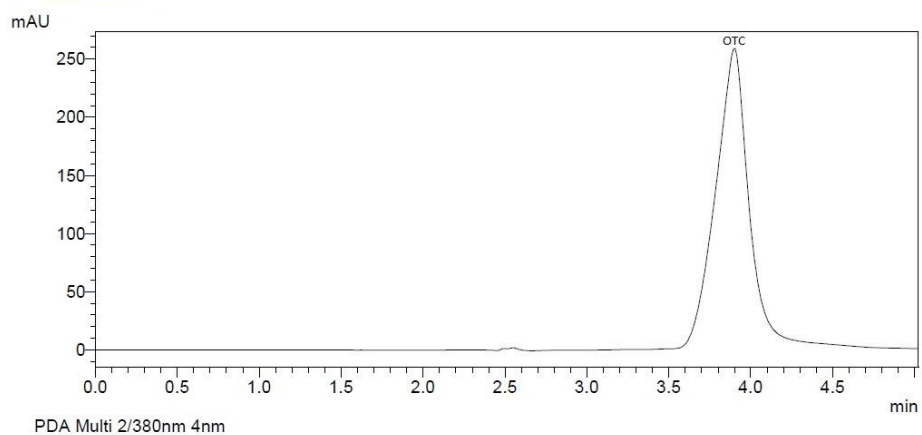


(b)

Figura 3.3 – Cromatograma CLAE-DAD da recuperação de OTC em água enriquecida com  $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$ , sendo (a) matriz água obtida do experimento piloto; (b) água Milli-Q.

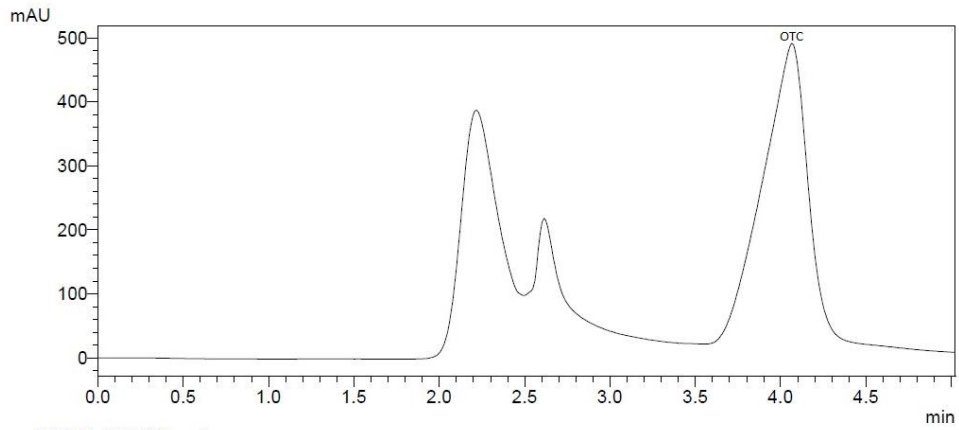


(a)

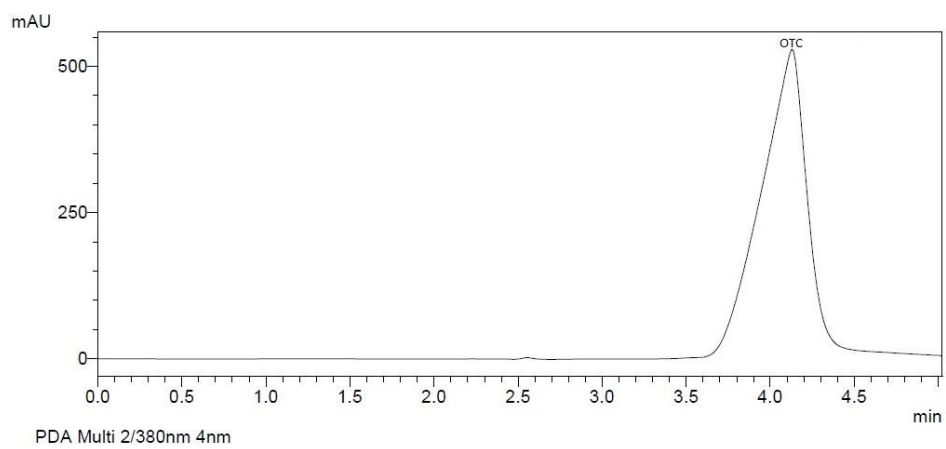


(b)

Figura 3.4 – Cromatograma CLAE-DAD da recuperação de OTC em água enriquecida com  $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ , sendo (a) matriz água obtida do experimento piloto; (b) água Milli-Q.



(a)



(b)

Figura 3.5 – Cromatograma CLAE-DAD da recuperação de OTC em água enriquecida com 2,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , sendo (a) matriz água obtida do experimento piloto; (b) água Milli-Q.

A regressão linear ( $r^2= 0,99$ ) obtida da curva padrão definida para as análises de OTC está representada na Equação 3.3 e na Figura 3.6.

$$y = 35227x - 169949 \dots \dots \dots \text{Equação 3.3}$$

em que: y = absorbância (mAu) e x = concentração de OTC ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

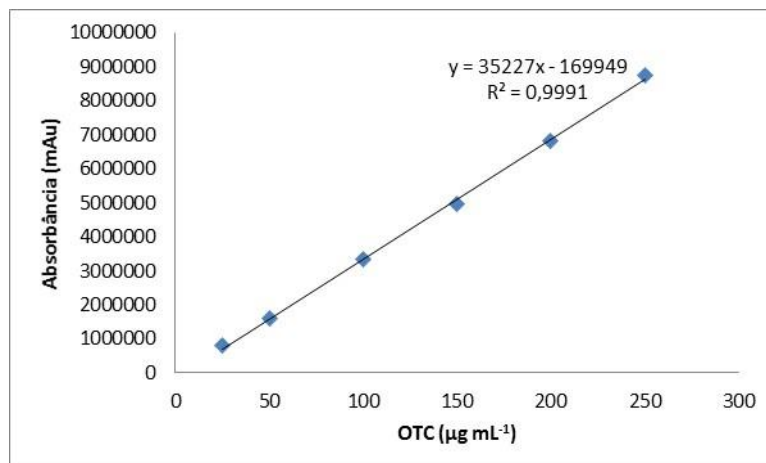


Figura 3.6 – Curva analítica para OTC em matriz água.

Os valores de área obtidos a partir dos cromatogramas das análises de OTC das amostras dos experimentos foram substituídos na curva (y) e corrigidos pelo valor de recuperação média e pelo fator concentração do método EFS. Em seguida foram transformados em porcentagem, considerando o valor inicial de OTC do sistema. Os valores foram ajustados à curva exponencial de decaimento e os tempos de meia vida de OTC foram obtidos pela Equação 3.4.

$$t^{1/2} = \ln(0,5) / -k \dots \dots \dots \text{Equação 3.4}$$

em que: k = coeficiente de decaimento de OTC, obtido pelo ajuste à curva exponencial de decaimento.

## 4.2 Decaimento de OTC

Os resultados para as variáveis pH, CE, e COD para as câmaras de decomposição de *E. najas* foram apresentados na seção 4, Parte II. Sempre que for necessário, os dados serão retomados na discussão. Seguem os resultados obtidos para os experimentos sem os detritos de macrófita.

### 4.2.1 Variações de pH e CE

Os valores de pH ao longo dos experimentos de decaimento de OTC em água estão apresentados na Figura 3.7. Não há diferença significativa ( $p = 0,42$ ) entre os valores obtidos nos sistemas sem adição de macrófita, aeróbio e anaeróbio. As médias dos valores

aferidos na condição aeróbia mantiveram-se dentro da mesma ordem de grandeza entre eles e entre os tempos de amostragem, exceto para um valor com grande desvio-padrão no Tratamento 7 (controle). A variação existente no Tratamento 7 ocorreu devido ao pH de uma das réplicas que foi significativamente inferior as demais. Os valores mínimos e máximos de pH estiveram entre 7,12 ( $\pm 0,06$ ) e 7,24 ( $\pm 0,05$ ) para o Tratamento 5; 7,07 ( $\pm 0,12$ ) e 7,31 ( $\pm 0,06$ ) para o Tratamento 6; 6,29 ( $\pm 1,38$ ) e 7,29 ( $\pm 0,04$ ) para o Tratamento 7. No experimento anaeróbio, os valores também não tiveram grande variação em relação à neutralidade. As variações foram de 6,80 ( $\pm 0,11$ ) a 7,32 ( $\pm 0,18$ ) no Tratamento 5; 6,91 ( $\pm 0,04$ ) e 7,30 ( $\pm 0,09$ ) para o Tratamento 6; e 6,94 ( $\pm 0,10$ ) e 7,19 ( $\pm 0,15$ ) para o Tratamento 7.

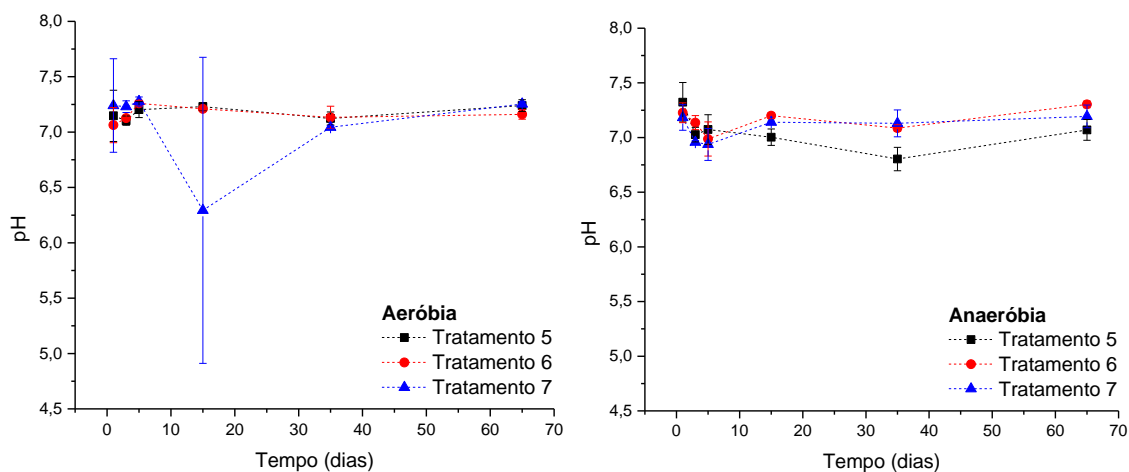


Figura 3.7 – Variação do pH ao longo do tempo para as condições aeróbia e anaeróbia. Tratamento 5 = Adição de OTC, Tratamento 6 = Adição de mistura de OTC e IMZ, Tratamento 7 = Controle.

Em relação à CE, apresentada na Figura 3.8, não foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os sistemas sem detritos de *E. najas*, dentro da mesma condição experimental. No entanto, foi encontrada diferença significativa ( $p = 0,0003$ ) entre os valores dos experimentos nas condições aeróbia e anaeróbia. Nos experimentos aeróbios, a oscilação dos valores de condutividade foi maior se comparada a dos experimentos anaeróbios. Em aerobiose, os valores de CE variaram de 18,14 ( $\pm 2,47$ ) a 25,57 ( $\pm 2,38$ )  $\mu\text{s cm}^{-1}$  no Tratamento 5; 16,34 ( $\pm 0,73$ ) a 26,97 ( $\pm 5,00$ )  $\mu\text{s cm}^{-1}$  no Tratamento 6; 16,76 ( $\pm 0,54$ ) a 26,03 ( $\pm 5,28$ )  $\mu\text{s cm}^{-1}$  no Tratamento 7. Nos experimentos anaeróbios, as variações foram entre 14,43 ( $\pm 0,15$ ) e 15,39 ( $\pm 0,29$ )  $\mu\text{s cm}^{-1}$  no Tratamento 5; 15,74 ( $\pm 0,08$ ) e 15,04 ( $\pm 0,53$ )  $\mu\text{s cm}^{-1}$  no Tratamento 6; 14,76 ( $\pm 0,12$ ) e 17,38 ( $\pm 2,13$ )  $\mu\text{s cm}^{-1}$  no Tratamento 7. Os valores mais altos da variável nos experimentos

aeróbios indicaram que a dissociação de compostos ionizáveis foi maior nessa condição experimental.

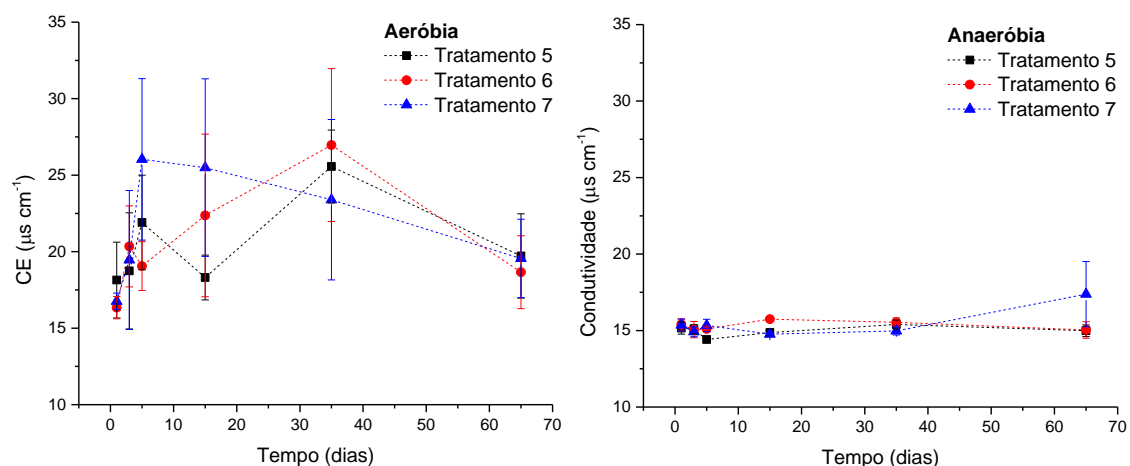


Figura 3.8 – Variação temporal da condutividade elétrica ao longo do tempo para as condições aeróbia e anaeróbia. Tratamento 5 = Adição de OTC, Tratamento 6 = Adição de mistura de OTC e IMZ, Tratamento 7 = Controle.

#### 4.2.2 Variações de COD

Para o COD, os tratamentos com adição de mistura de OTC e IMZ tiveram valores acima dos obtidos para o Tratamento 7, sem os compostos. OTC e IMZ são compostos orgânicos com uma fração importante de carbono na composição molecular. Na molécula de cloridrato de oxitetraciclina 53,18% de sua massa molecular corresponde ao carbono. Na molécula de IMZ, essa fração é de 56,58%. Assim, o Tratamento 5 partiu, no início do experimento, com uma diferença de 0,85 mg de C em relação ao Tratamento 7. Essa diferença para o Tratamento 6 em relação ao Tratamento 7 foi de 2,66 mg.

A tendência de decaimento do COD ao longo dos experimentos é semelhante para todos os tratamentos, como pode ser observado na Figura 3.9. Tanto para a condição aeróbia quanto para a condição anaeróbia, foi definida diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o Tratamento 7 e o Tratamento 6 apenas. Essa diferença ocorreu justamente pela massa de carbono inicial que é maior na adição conjunta de OTC e IMZ.

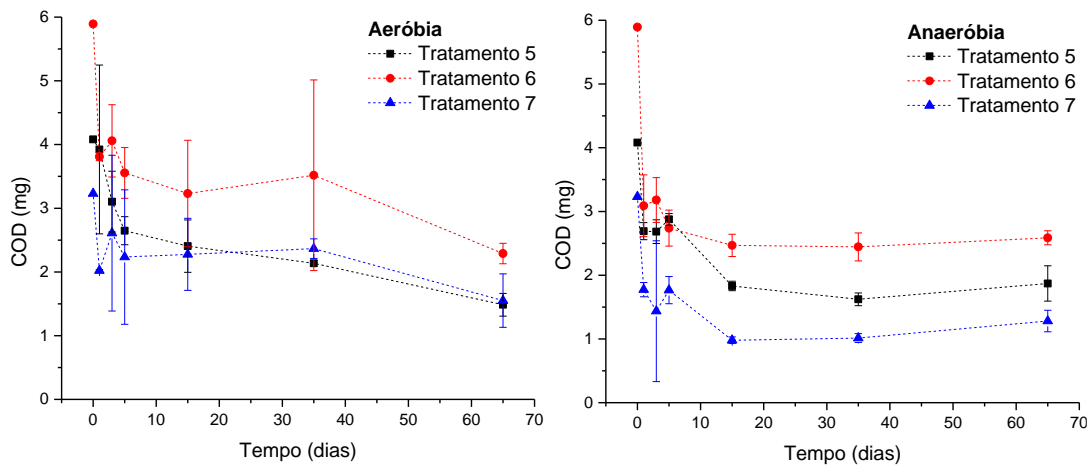


Figura 3.9 – Variação do COD ao longo do tempo para as condições aeróbia e anaeróbia. Tratamento 5 = Adição de OTC, Tratamento 6 = Adição de mistura de OTC e IMZ, Tratamento 7 = Controle.

### 4.2.3 Variações de OTC

Os dados obtidos nas análises de OTC (Figura 3.10), mostraram que há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o decaimento do composto nas câmaras com e sem detritos da macrófita, para ambas as condições experimentais.

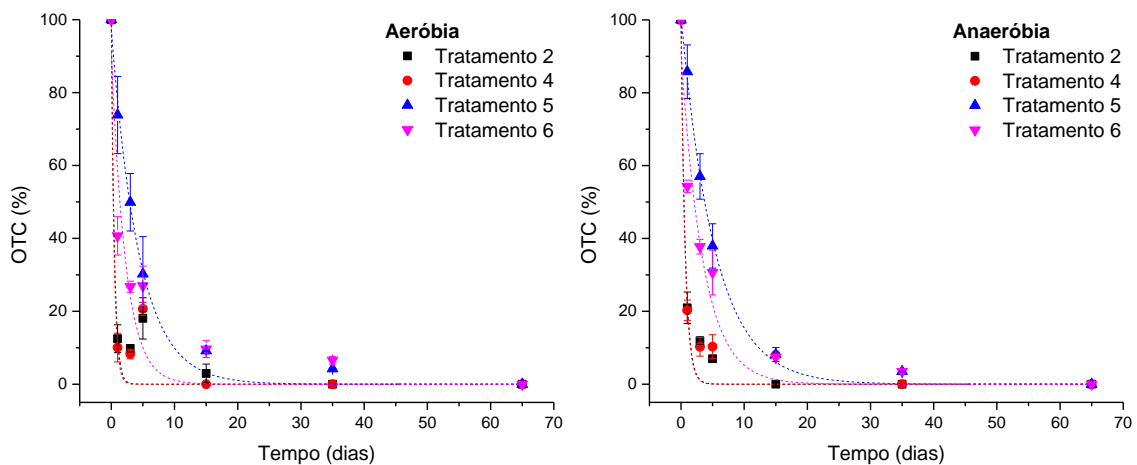


Figura 3.10 – Variação temporal da OTC ao longo do tempo para as condições aeróbia e anaeróbia. Tratamento 5 = Adição de OTC, Tratamento 6 = Adição de mistura de OTC e IMZ.

Em aerobiose, nas câmaras de decomposição com a *E. najas*, cerca de 87% a 90% do composto inicialmente introduzido no sistema não foram recuperados nas extrações no primeiro dia de análise, e o tempo de meia-vida foi de 0,34 dia no Tratamento 2 e 0,31 dia no Tratamento 4. Para o Tratamento 5, o tempo de meia-vida foi 3,03 dias e o



decaimento da OTC em 24 horas foi de cerca de 26%. No Tratamento 6, o tempo de meia-vida foi de 1,57 dias, com decaimento inicial de 60%. Para as incubações com macrófita, os picos cromatográficos para OTC estavam abaixo dos limites de quantificação do método a partir de 15 dias de amostragem. No Tratamento 2, o composto foi quantificado até o trigésimo quinto dia de experimento, mas não foi detectado no último dia de análise.

Os tempos de meia vida obtidos para a OTC na presença do IMZ foram menores do que os comparados aos dados sem o IMZ, sendo isso mais evidente na ausência de detritos. Na presença de detritos tanto a OTC quanto o IMZ podem ser adsorvidos pela MOP e as moléculas livres em solução possuem menor interação entre si. Sem os detritos, as moléculas de IMZ em solução podem ter se associado às moléculas de OTC e inibido a ligação desta com a fase estacionária do cartucho empregado na extração. Como não foram realizados testes de recuperação no desenvolvimento do método na presença de IMZ, este é apenas um argumento especulativo.

Nas câmaras da condição anaeróbia com fragmentos de *E. najas* (Tratamentos 2 e 4), cerca de 80% do composto inicialmente introduzido no sistema não foram recuperados nas extrações no primeiro dia de análise, indicando tempos de meia-vida em 0,47 e 0,45 dia para o composto nestes sistemas (Tabela 3.1). Os picos cromatográficos observados a partir do décimo quinto dia de experimento estavam abaixo do limite de quantificação estabelecido pelo método de análise e não foram detectados nos dois últimos períodos amostrais.

Para os sistemas sem macrófita, o composto foi quantificado até o trigésimo quinto dia de experimento, mas não pôde ser quantificado no último dia de análise. Espera-se que produtos intermediários da degradação da OTC tenham sido formados por oxidação e hidrólise (GARCIA-RODRÍGUEZ et al., 2013). O tempo de meia-vida do composto foi 3,69 dias (Tabela 3.1), com decaimento menor do que 15% 24 horas após o início do experimento, no Tratamento 5. No Tratamento 6, o decaimento de OTC do início ao primeiro dia de análise foi de aproximadamente 45%. Para essas incubações, o tempo de meia-vida foi de 2,42 dias.

Tabela 3.1 – Parâmetros para os decaimentos da OTC ao longo do tempo para as condições aeróbia e anaeróbia. Em que: k = coeficiente de decaimento, r<sup>2</sup> = coeficiente de ajuste do modelo, t<sub>1/2</sub> = tempo de meia-vida. Tratamento 5 = Adição de OTC, Tratamento 6 = Adição de mistura de OTC e IMZ.

	Aeróbia			Anaeróbia		
	k	r <sup>2</sup>	t <sub>1/2</sub> (dia)	k	r <sup>2</sup>	t <sub>1/2</sub> (dia)
<b>Tratamento 2</b>	2,04	0,93	0,34	1,48	0,97	0,47
<b>Tratamento 4</b>	2,27	0,92	0,31	1,53	0,96	0,45
<b>Tratamento 5</b>	0,23	0,99	3,03	0,19	1,00	3,69
<b>Tratamento 6</b>	0,44	0,86	1,57	0,29	0,94	2,42

A comparação entre os resultados obtidos para as concentrações de OTC mostraram que o detrito de *E. najas* foi responsável por aproximadamente 61% de retenção do composto em relação ao que foi encontrado no Tratamento 1, aeróbio, e 51% nos experimentos na condição anaeróbia, no primeiro dia de análise. Doi e Stoskopf (2000) avaliaram a cinética de degradação da OTC em água deionizada e encontraram tempo de meia-vida de 6,27 dias na presença de substrato orgânico, em pH 7,0, a 25 °C. Quando o mesmo experimento foi conduzido com substrato sem a porção orgânica, o tempo de meia-vida encontrado foi de 11,56 dias e sem qualquer substrato, apenas em água deionizada, o tempo de meia-vida foi ainda maior, em torno de 14 dias. Os autores relataram a possibilidade de adsorção da OTC no substrato mesmo com apenas 5 minutos de contato, o que explicaria a diferença entre as concentrações de OTC encontradas ao longo do tempo nos diferentes tratamentos. Sanderson et al. (2005), em experimentos realizados com microcosmos no ambiente, contendo sedimentos naturais, encontraram valores de tempos de meia-vida entre 1,02 e 2,74 dias para o composto, considerando o pH do sistema em torno de 8,2 e a temperatura próxima aos 19 °C.

As interações que a molécula de OTC faz com a matéria orgânica e substâncias húmicas originadas dos processos de decomposição são fortemente influenciadas pelo pH do meio (TOLLS, 2001; THIELE-BRUHN, 2003). A molécula de OTC apresenta 3 valores de pKa (constante de dissociação ácida) atribuídos a ionização dos grupamentos hidroxila e amina (pKa1 = 3,57), hidroxilas-carbonila (pKa2 = 7,49) e amina secundária (pKa3 = 9,88) (ZHAO et al., 2013). Desta forma, a molécula possui carga localizada em todos os valores de pH do meio, estando protonada em meio ácido e desprotonada em meio alcalino. O estado neutro ou zwitterión, condição na qual a molécula possui cargas positivas e negativas distribuídas em sua estrutura, é alcançado em pH próximo de 5 (ZHAO et al., 2013). Assim, pH e a força iônica decorrentes da ionização dos sítios de

ligação referentes a cada valor de pKa determinam as propriedades e especiação da molécula, as reações de hidrólise, bem como as interações intramoleculares e intermoleculares no meio (FIGUEROA; LEONARD; MACKAY, 2004).

Estudos sobre adsorção de tetraciclinas e OTC em substrato argiloso, mostram que a protonação do grupo amina da molécula é responsável por reações de troca catiônica que diminuem com aumento do pH, já que estas são mais efetivas em meio ácido. O aumento do pH e presença de MOD inibe a sorção ao substrato mineral, sendo essa inibição mais forte em pH 5 (KULSHRESTHA; GIESE; AGA, 2004; AGUZZI et al., 2007; PAROLO et al., 2008).

No atual estudo, os tratamentos se diferenciaram pela presença ou ausência do detrito vegetal, mas a água utilizada nos experimentos foi a mesma coletada no ambiente. Desta forma, outras forças devem atuar no decaimento do composto ao longo do tempo, mesmo sem a presença do detrito. A molécula de OTC tende a ser mais instável em solução aquosa quando em pH neutro e alcalino, por ação da hidrólise (KÜMMERER 2009a; XUAN et al. 2010). Os valores de meia-vida para OTC em solução aquosa variam de 14 a 114 horas, sendo que quanto maior o pH, menor é a estabilidade da molécula. Os valores de meia-vida encontrados na literatura são de 26 horas em pH 7 e 33 horas em pH 8,5 (USFDA ERA, 1989). Os resultados de Doi e Stoskopf (2000) mostram o mesmo padrão de estabilidade de OTC em relação ao pH. Em soluções aquosas, utilizando água deionizada, os autores encontraram uma diferença de cerca de 37 dias para o decaimento de 50% do composto no meio ácido (pH 3) em comparação ao meio alcalino (pH 10).

A decomposição da OTC, assim como de outros compostos orgânicos, também é fortemente influenciada pelo potencial de oxidação do meio (INGERSLEV et al., 2001; YING; YU; KOOKANA, 2007; CHENXI; SPONGBERG; WITTER, 2008) e existência de microbiota heterotrófica em atividade no sistema (YANG et al., 2009). Em aerobiose, o receptor final de elétrons das reações de respiração microbiana é o oxigênio molecular. Na ausência deste, receptores de elétrons alternativos podem ser utilizados pela respiração microbiana. Os processos de decomposição sob aerobiose, na presença do acceptor oxigênio, são energeticamente mais eficientes do que os processos na ausência de oxigênio (MADIGAN et al. 2009). Visto que nesse trabalho não foi utilizada água estéril, e sim água coletada da represa contendo sua microbiota preservada sob as condições experimentais estabelecidas, pode-se concluir que a decomposição de OTC foi acelerada pela presença de microrganismos que puderam utilizar o carbono das moléculas de OTC de forma mais eficiente e mais rápida na condição aeróbia.

## **Parte IV**

---

### **Discussão Geral, Conclusões e Perspectivas**

## 1 Discussão geral

A decomposição de macrófitas aquáticas é extensivamente retratada, considerando os efeitos de diversos aspectos (i.e. função de forças) bióticos e abióticos sobre o processo de mineralização da matéria orgânica detrital (HARRISON; MANN, 1975; GODSHALK; WETZEL, 1978; SMOCK, 1980; BELOVA, 1993; BATTLE; MIHUC, 2000; BIANCHINI JÚNIOR; PACOBAHYBA; CUNHA-SANTINO, 2002; DAVIS et al., 2003; CUNHA-SANTINO; BIANCHINI JÚNIOR; OKAWA, 2010; QUINTÃO; REZENDE; GONÇALVES JÚNIOR, 2013; SONG et al., 2013; BIANCHINI JÚNIOR. et al., 2014; ZHANG et al., 2014). No entanto, não existem informações a respeito dos efeitos de antimicrobianos sobre a decomposição de macrófitas aquáticas com enfoque nos parâmetros cinéticos observados neste trabalho.

A atuação microbiana sobre a decomposição de detritos vegetais ocorre pela ação conjunta de bactérias e fungos. A partir dos dados apresentados nesse trabalho, procurou-se compreender como estressores a essas comunidades poderiam afetar a atuação desses organismos sobre a decomposição de detritos de *E. najas*. Os antimicrobianos OTC e IMZ foram escolhidos por serem compostos usualmente utilizados no controle de amplo espectro de bactérias e fungos, respectivamente.

De fato, os resultados sobre sensibilidade da comunidade microbiana da coluna d'água da Represa do Beija-Flor, mostraram que a comunidade bacteriana foi suscetível à OTC mesmo em baixas concentrações. A concentração de 2,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de OTC foi mais efetiva na inibição de crescimento de colônias bacterianas, mas mesmo com 0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de OTC essa inibição já havia sido aparente, nos dois meios de cultura testados. Possivelmente, concentrações menores deste antimicrobiano podem ter efeito inibidor sobre a comunidade bacteriana das águas da represa. Halling-Sørensen, Sengeløv e Tjørnelund (2002) encontraram uma concentração efetiva mediana ( $CE_{50}$ ) de 0,08  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de OTC sobre o crescimento de UFC de bactérias aeróbicas do lodo ativado de um tanque de aeração, em uma estação de tratamento de águas residuais. Embora as comunidades microbianas e o método experimental de análise da sensibilidade sejam diferentes, os autores acima citados corroboram o quanto esse composto pode ser efetivo no controle do crescimento microbiano, mesmo em baixas concentrações.

A ação da OTC sobre a comunidade bacteriana também foi clara pela análise dos perfis dos géis de DGGE obtidos a partir das amostras das câmaras de decomposição. Para os bioensaios aeróbios, foi observada maior similaridade entre os perfis das amostras

das câmaras de decomposição com OTC, e entre os perfis das amostras das câmaras de decomposição sem OTC, em cada tempo de amostragem. Esse dado pode indicar que a OTC atuou sobre as populações sensíveis ao composto, enquanto populações pouco sensíveis se estabeleceram nas câmaras sem OTC. A atuação da OTC sobre a estrutura da comunidade bacteriana também foi evidenciada no trabalho de Wang et al. (2015) que avaliou os perfis de DGGE de amostras obtidas de reatores em batelada para tratamento de águas residuais. Os autores encontraram variações nos perfis de DGGE, tanto em número de bandas quanto em intensidade de bandas, em função da concentração de OTC testada. Segundo os autores a concentração de 2 mg L<sup>-1</sup> alterou a estrutura da comunidade, sendo que em concentrações maiores, como de 12 mg L<sup>-1</sup>, prevaleceram as espécies com maior tolerância à toxicidade do composto.

Este mesmo padrão não pôde ser observado para as câmaras anaeróbias. Nesse caso, observou-se um período de adaptação com redução das populações sensíveis à OTC no início do experimento. No entanto, não foi observada uma definição clara de semelhança dos perfis do DGGE das câmaras com OTC entre si. De certa forma, pode-se inferir que a OTC não influenciou nitidamente o metabolismo das bactérias anaeróbias a ponto de alterar de forma consistente a comunidade bacteriana associada à função de decomposição dos detritos de *E. najas*, sob os diferentes tratamentos.

Os testes de sensibilidade aplicados para determinar a concentração de OTC utilizada nas câmaras de decomposição privilegiaram o crescimento de bactérias aeróbias e por isso não foi possível estabelecer a concentração efetiva do antimicrobiano à comunidade anaeróbia e/ou facultativa. Assim, pode-se supor que a concentração utilizada não tenha sido suficiente para afetar as células sob essa condição metabólica, ou ainda que após o estabelecimento da condição anaeróbia, os mecanismos celulares de absorção e de efluxo do composto foram diferentes do que aqueles encontrados em aerobiose (CHOPRA, 2002). Não foram esperados nesse caso, mecanismos metabólicos intracelulares de inativação do composto já que estes processos são raros e específicos de ambientes oxidantes (SPEER; SHOEMAKER; SALYERS, 1992).

Os mecanismos de transporte de OTC entre o meio externo e o interior das células parecem estar associados, entre outros fatores, à especiação da molécula. As moléculas de OTC entram na célula microbiana pela membrana celular, por mecanismos dependentes de energia (MCMURRY et al., 1981) sendo regidos pela variação de pH (CHOPRA; ROBERTS, 2001). A OTC atravessa a membrana externa de bactérias Gram-negativas quelada a íons metálicos, geralmente magnésio (Mg), pelos canais de porina,

formando o complexo carregado positivamente. A força que rege o equilíbrio de Donnan faz com que o complexo catiônico seja atraído e atravesse a membrana, sendo acumulado no periplasma (SCHNAPPINGER; HILLEN, 1996). Em células Gram-positivas, as características de neutralidade da molécula contribuem para que esta seja absorvida pelas células bacterianas (CHOPRA; ROBERTS, 2001).

A captação de OTC pelas células bacterianas é favorecida, desta forma, quando o pH do meio encontra-se entre 5,5 e 6,0, já que nesta faixa prevalece a forma neutra da molécula e existe um maior gradiente lipofílico (COLAIZZI; KLINK, 1969). Isso implicaria dizer que os bioensaios anaeróbios teriam favorecido a incorporação das moléculas de OTC pelas células bacterianas, até ao menos o décimo quinto dia em que o pH do meio esteve com valores na faixa da neutralidade iônica da molécula. No entanto, isso não foi o observado. Ao contrário, nos bioensaios aeróbios, em que os valores de pH estiveram acima de 6,0 houve maior ação da OTC sobre a atividade microbiana.

A molécula de OTC possui estrutura complexa com diversos sítios de ligação que podem ser coordenados a íons metálicos e facilitar a entrada da molécula na célula (PEREIRA-MAIA et al., 2010). Os grupos doadores de elétrons estão presentes em diversos pontos da estrutura molecular e são dependentes do pH do meio e da disponibilidade de íons metálicos (DE ALMEIDA et al., 1998). Nos bioensaios aeróbios, a lixiviação acentuada de minerais ionizáveis do detrito vegetal pode ter gerado um *pool* de íons metálicos disponíveis aos sítios de coordenação da molécula, facilitando a entrada da OTC nas bactérias. A disponibilidade de íons foi comprovada pelos altos valores de CE encontrados nos experimentos (Figura 2.11). Adicionado a isso, em pH acima de 6,0 e abaixo de 9,0, a ionização aniônica de sítios de ligação podem favorecer a complexação a íons metálicos (ZHAO et al., 2013).

A OTC é um antibiótico de amplo espectro que tem ação bacteriostática ao ligar-se reversivelmente à subunidade 30S dos ribossomos. O complexo OTC-30S impede a ligação do aminoacil ARN de transferência (tARN) aos ribossomos e como resultado há o bloqueio da adição de aminoácidos para a cadeia protéica (SPEER; SHOEMARKER; SALYERS, 1992). Isso faz com que a síntese e liberação de proteínas sejam inibidas (BRODERSEN et al., 2000). Desta forma, pode-se inferir que a ação da OTC sobre a parte sensível da comunidade microbiana pode ter sido responsável pela diferença nas constantes de decaimento de  $COP_R$  e COD nos Tratamentos 2 e 4, dos experimentos aeróbios, e consequente aumento do tempo de meia-vida para essas frações do CO.

A decomposição da fração refratária que constitui o COP é fortemente influenciada pela ação do metabolismo catabólico da microbiota. A fração refratária de CO é composta por fibras constituídas de polissacarídeos, como celulose e hemiceluloses, e lignina que são hidrolisadas e oxidadas por ação enzimática (CUNHA-SANTINO; SCIESSERE; BIANCHINI JÚNIOR, 2008). Os complexos enzimáticos responsáveis por esse processo podem ser constituídos por endo e exoenzimas, atuantes de forma sinérgica e por ação individual de espécies ou por consórcios microbianos. Assim, os resultados indicaram que a atuação da OTC sobre a síntese proteica pode ter diminuído a produção de enzimas necessárias ao processo de despolimerização da celulose e hidrólise das hemiceluloses, diminuindo a constante de decaimento dessa fração do CO. Além disso, atuando sobre parte sensível da microbiota, a OTC reduziu a capacidade assimilatória do COD, diminuindo também a sua constante de decaimento nos tratamentos com OTC.

Alguns autores têm relatado a influência dos antimicrobianos lançados no ambiente sobre a estabilidade das comunidades microbianas e as funções ecológicas que desempenham (THIELE-BRUHN; BECK, 2005; KOTZERKE et al., 2008; FAN et al., 2009). Assim que um antimicrobiano entra no ecossistema, ele pode ser compreendido como um fator determinante na evolução e estrutura funcional das comunidades microbianas (AMINOV; MACKIE, 2007), alterando a abundância relativa de espécies. Como consequência são modificadas as interações interespecíficas estabelecidas naturalmente (DING; HE, 2010).

Sob esse aspecto, os resultados desse trabalho mostram que as pequenas alterações nos parâmetros cinéticos de decomposição dos detritos de *E. najas*, na presença de OTC, indicam o efeito sobre a atividade microbiana, mas não necessariamente que tenha havido a alteração na estrutura funcional da comunidade. Isso implica dizer que o efeito do antibiótico nas condições experimentais não foi capaz de alterar as vias oxidativas da decomposição da MO e esta se manteve, mesmo que em taxas mais reduzidas, na presença da OTC.

A estrutura da comunidade microbiana em reação a um distúrbio (i.e. estressor) assume quatro comportamentos distintos, regidos por diferentes mecanismos não concorrentes, segundo revisão de Allison e Martiny (2008): (i) após o distúrbio, a comunidade pode ser modificada ou mantida, em densidade e diversidade, por mecanismos de resistência relacionados à flexibilidade fisiológica e tolerância metabólica; (ii) caso seja alterada, a rápida adaptação, através da transferência horizontal de genes, associada às elevadas taxas de crescimento, garante características de resiliência



à comunidade microbiana que retorna ao seu estado inicial; (iii) a atividade funcional é mantida, não obstante à perda de espécies e densidade microbianas; (iv) há perda da diversidade funcional, sem possibilidade de retorno ao estado original de equilíbrio.

A intensidade com que o antimicrobiano atua como agente estressor da comunidade microbiana e a forma como esta reage ao agente está associado a fatores particulares de cada evento perturbador. Em revisão sobre os efeitos de antimicrobianos, Ding e He (2010) citam alguns fatores que definem a dimensão da ação desses compostos a populações microbianas afetadas. Entre estes fatores podem ser citados a concentração do composto disponível à captação pelas células microbianas; tempo de exposição; características químicas das moléculas e destinos no ambiente, associados aos processos de sorção, transporte e transformações; propriedades do meio em que ocorre a perturbação como pH, potencial oxi-redutor, presença ou ausência de matéria orgânica, composição mineral, entre outros.

Nos experimentos conduzidos nesse trabalho, os antimicrobianos foram adicionados apenas no início do experimento e em concentração sub-inibitória. Ou seja, embora a ação antimicrobiana sobre os organismos alvo tenha ocorrido, esta pode ter sido reduzida pelos processos de degradação do compostos e adsorção à MOP presente nas câmaras de decomposição. A adsorção do antimicrobiano à MO foi demonstrada pelas diferenças obtidas nas concentrações de OTC na presença e ausência de detritos de *E. najas*. Os dados apresentados nesse trabalho mostram que apenas cerca de 10% do composto adicionado no sistema estavam biodisponíveis em solução um dia após o início do experimento, nas câmaras aeróbias, o que pode ter reduzido seu efeito sobre a microbiota. A redução do efeito de antimicrobianos por fenômenos de adsorção ao substrato foi relatada no trabalho de Córdova-Kreylos e Scow (2007). Os autores concluíram que ação de ciprofloxacina sobre a microbiota de áreas pantanosas é reduzida de forma diretamente relacionada à capacidade de adsorção dos sedimentos que compunham a área estudada.

Nas câmaras sob aeração, onde foram observados efeitos dos antimicrobianos sobre os processos de decomposição dos detritos de *E. najas*, notou-se que a adição conjunta de OTC e IMZ não gerou maior injúria à microbiota do que a ação individual da OTC. Isso pode ser observado pelos perfis dos géis de DGGE e pela parametrização do modelo cinético de decomposição da macrófita. A comparação dos processos de decomposição mostrou que, embora a diferença nas constantes de decaimento de COD e COP<sub>R</sub> tenha sido pequena entre os tratamentos, a velocidade de decaimento do CO é

maior no Tratamento 1 (controle sem adição de antimicrobianos), seguida pelo Tratamento 3 (com adição de IMZ), Tratamento 4 (adição conjunta de IMZ e OTC) e finalmente o Tratamento 2 (com adição de OTC).

Este resultado evidencia que não houve efeito sinérgico e/ou aditivo entre OTC e IMZ, como relatado em outros trabalhos. Christensen, Ingerslev e Baun (2006) avaliaram a toxicidade de diferentes misturas contendo os antimicrobianos oxitetraciclina, ácido oxolínico, eritromicina, florfenicol e flumequina sobre diferentes grupos de microrganismos, incluindo cultura mista. Os autores encontraram ação sinérgica e aditiva dos antimicrobianos dependendo da mistura que foi aplicada aos testes. A mistura de antimicrobianos com a mesmo mecanismo de ação geraram efeitos aditivos na maioria dos casos, enquanto que o efeito sinérgico foi obtido na maioria dos casos em que as características dos antimicrobianos eram diferentes entre si.

Neste estudo, a expectativa sobre a adição da mistura de OTC e IMZ (Tratamento 4) nas câmaras de decomposição era a obtenção de efeito sinérgico sobre a comunidade microbiana e com isso maior redução da constante de decaimento de CO nas câmaras de decomposição desse tratamento. A OTC e IMZ são compostos com mecanismos de ação diferentes que afetam mais fortemente diferentes grupos de microrganismos. Enquanto a OTC é atuante sobre células bacterianas, o IMZ é um composto com ação sobre fungos, inibindo a síntese do ergosterol na parede celular (SUN et al., 2011).

No entanto, o esperado não foi observado. A OTC sozinha apresentou maior efeito sobre a decomposição do que quando adicionada em mistura com o IMZ. Os dados sobre decaimentos de OTC nas câmaras com IMZ sugeriram que a disponibilidade do composto pode ter sido alterada pela complexação ao IMZ. Esse fato foi corroborado pelos resultados obtidos para decaimento de OTC nas câmaras sem a presença da macrófita. Mesmo sem os detritos, as concentrações de OTC em solução obtidas ao longo do experimento foram menores nas câmaras com IMZ, evidenciando que além da adsorção, a complexação a outros compostos orgânicos pode alterar a disponibilidade dos antimicrobianos à microbiota.

De acordo com a literatura, a decomposição de detritos vegetais no ambiente aquático é fortemente influenciada pela ação de fungos e pseudofungos sapróbios (KAUSHIK; HYNES, 1971). Entre eles, podem ser citados os hifomicetos aquáticos (GESSNER; CHAUVET, 1994), geofungos e os organismos zoospóricos e leveduras (MARANO et al., 2011; SILVA; IZABEL; GUSMÃO, 2014). No ambiente, admite-se que os fungos são mais ativos do que as bactérias durante os primeiros estágios de

decomposição, já que a fixação desses organismos na superfície do substrato aumenta o teor de nitrogênio (expresso em proteínas) e torna os detritos mais palatáveis e nutritivos para os macroinvertebrados fragmentadores (BARLOCHER, 1985). Os fungos podem ainda penetrar no substrato vegetal, através de suas hifas, o que facilita sua atuação sobre os processos de decomposição (PORTNER; NEWELL; LINGLE, 1989). A partir disso, os detritos com maior área de superfície podem ser mais facilmente colonizados por bactérias atuantes sobre as frações recalcitrantes do substrato (BENGTSSON, 1992).

As interações entre fungos e bactérias na decomposição de detritos vegetais não são totalmente esclarecidas, e são muito particulares de escalas temporais e espaciais, das características das populações de microbianas envolvidas, da disponibilidade nutricional do meio em que se analisa o processo etc. Gulis e Suberkropp (2003) citam que os microrganismos podem interagir entre si através de uma variedade de mecanismos, como a concorrência direta de recursos, a produção de metabólitos secundários com atividade antibiótica ou fornecimento de fatores de crescimento.

Neste trabalho, pode-se inferir que a ação bacteriana sobre a decomposição de *E. najas* foi mais efetiva que a de fungos possivelmente presentes nas câmaras de decomposição sob aeração. Nas câmaras sem aeração não era esperada atuação expressiva de fungos em qualquer dos tratamentos, devido à baixa concentração de oxigênio dissolvido. Embora não existam dados sobre possíveis modificações dos perfis da comunidade fúngica nas câmaras de decomposição, pode-se supor que a pequena alteração nas taxas de decomposição de detritos nas câmaras contendo apenas IMZ não foi tão expressiva como nas câmaras contendo apenas OTC.

Algumas especulações para esses resultados podem ser levantadas, como a baixa densidade de fungos presentes no inóculo utilizado nos experimentos ou a baixa sensibilidade da comunidade fúngica ao composto aplicado. Os testes de sensibilidade da microbiota ao IMZ mostraram que dependendo do meio de cultura utilizado a sensibilidade da comunidade ao composto muda. Para um dos meios de cultura a redução no crescimento ocorreu com a concentração de  $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ , enquanto no outro, esta concentração foi de  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Assim a escolha da concentração intermediária,  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ , pode não ter sido suficiente para afetar de forma mais contundente a comunidade fúngica. Associado a isso, podem ser citados também os fenômenos de adsorção do IMZ à matéria orgânica, que parecem ser mais eficientes em meio alcalino (HU et al., 1998) e também, os processos de degradação do composto que podem ter reduzido sua disponibilidade para atuação sobre a microbiota.

## 2 Conclusões

Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que a presença de antimicrobianos em água pode alterar as taxas de decomposição das frações refratárias de detritos vegetais e a mineralização das frações de carbono orgânico dissolvido, dependendo das condições ambientais.

De acordo com as condições experimentais estabelecidas neste trabalho, o coeficiente de mineralização do carbono orgânico particulado refratário foi menor para bioensaios de decomposição aeróbia de *E. najas* na presença da OTC. O mesmo ocorreu para o coeficiente de mineralização do carbono orgânico dissolvido oriundo do processo. Na decomposição anaeróbia não houve relação entre as alterações destes coeficientes com a presença do composto OTC.

A ação do antifúngico IMZ não pareceu estar relacionada às variações dos parâmetros cinéticos de decomposição de *E. najas* para as duas condições experimentais estabelecidas nesse trabalho. Não houve ação sinérgica de OTC e IMZ sobre a comunidade microbiana responsável pela decomposição de *E. najas*.

As comunidades bacterianas foram modificadas em função dos tratamentos e do tempo de experimentos. O tempo de experimento foi definitivo para a determinação dos valores de similaridade e agrupamentos obtidos nas análises UPGMA, nas duas condições experimentais.

A OTC sofreu adsorção aos detritos de *E. najas* e o tempo de meia-vida da molécula em solução aquosa foi diminuído em função da presença de tais detritos. O decaimento da OTC em solução aquosa é mais rápido em aerobiose do que em anaerobiose, na presença ou na ausência de detritos vegetais.

## 3 Perspectivas

Os resultados e discussão apresentados neste trabalho, evidenciaram algumas lacunas que podem servir de motivação para futuras pesquisas com enfoque sobre ação de antimicrobianos na decomposição de macrófitas aquáticas.

São necessários mais estudos sobre a estrutura da comunidade microbiana, com identificação de espécies dos diferentes grupos envolvidos no processo. Assim, será possível compreender como ocorre a ação específica dos antimicrobianos e como são estabelecidas as sucessões das populações ao longo do tempo.

Além disso, será necessário avaliar o processo de decaimento de todos os compostos utilizados na pesquisa para que se compreenda, de forma mais clara, sua disponibilidade aos microrganismos. Com isso, poderão ser avaliadas as possibilidades de efeitos aditivo, sinérgico ou antagônico sobre as comunidades microbianas.

O estudo da decomposição de detritos pode ser conduzido por um tempo mais prolongado e com adição dos antimicrobianos abaixo da concentração de efeito. Ademais, poderá ser avaliado o efeito crônico desses compostos, com adições múltiplas de antimicrobianos ao longo do tempo. Desta forma, haverá maior paridade entre o que acontece no ambiente e os experimentos conduzidos em laboratório.

## Referências Bibliográficas

---

ABREU, A. A. et al. Engineered heat treated methanogenic granules: A promising biotechnological approach for extreme thermophilic biohydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 24, p. 9577–9586, 2010.

AGUZZI, C. et al. Use of clays as drug delivery systems: Possibilities and limitations. **Applied Clay Science**, v. 36, n. 1-3, p. 22–36, 2007.

ALBER, M.; VALIELA, I. Biochemical composition of organic aggregates produced from marine macrophyte-derived dissolved organic matter. **Limnology and Oceanography**, v. 39, n. 3, p. 717–723, 1994.

ALLISON, S. **Allison Lab Protocol: Nutrient Analysis**. 2008 Disponível em: <<http://allison.bio.uci.edu/protocols/nutrientanalyses.pdf>>. Acesso em: 14 fev. 2013.

ALLISON, S. D.; MARTINY, J. B. H. Colloquium paper: Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 1, p. 11512–11519, 2008.

AMINOV, R. I.; MACKIE, R. I. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 271, n. 2, p. 147–161, 2007.

ANDREWS, J. H.; HARRIS, R. F. r- and K-selection and microbial Ecology. **Advances in Microbial Ecology**, v. 9, p. 99–147, 1986.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 17 ed. Washington: APHA, 1998. 1193 p.

ATLAS, R. M. **Handbook of microbiology media**. 3 ed. London: CRC Press, 1946. 2051 p.

AVISAR, D. et al. Sorption of sulfonamides and tetracyclines to montmorillonite clay. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 209, n. 1-4, p. 439–450, 2010.

AWAD, Y. M. et al. Veterinary antibiotics contamination in water, sediment, and soil near a swine manure composting facility. **Environmental Earth Sciences**, v. 71, n. 3, p. 1433–1440, 2014.

AYRES, M. et al. **BIOESTAT - Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Bio-Médicas**. Mamirauá, 2007. Disponível em: <<http://www.mamiraua.org.br/pt-br/downloads/programas/bioestat-versao-53/>>. Acesso em: 15 out. 2014.

AZAM, F. et al. The ecological role of water-column microbes in the sea. **Marine Ecology Progress Series**, v. 10, p. 257–263, 1983.

BABIĆ, S. et al. Solid phase extraction and HPLC determination of veterinary pharmaceuticals in wastewater. **Talanta**, v. 70, n. 4, p. 732–738, 2006.

BÄRLOCHER, F. The role of fungi in the nutrition of stream invertebrates. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 91, n. 1-2, p. 83–94, 1985.

BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M.; ARAÚJO, M. Recomendações para calibração em química analítica - Parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 856–865, 2002.

BARRON, L. et al. **Report Series No . 34 Occurrence and Fate of Pharmaceuticals and Personal Care Products within Sewage Sludge and Sludge-Enriched Soils (2005-FS-30-M1) STRIVE Report**. EPA - Environmental Protection Agency, 2013. 73 p.

BATTLE, J. M.; MIHUC, T. B. Decomposition dynamics of aquatic macrophytes in the lower Atchafalaya, a large floodplain river. **Hydrobiologia**, v. 418, n. 1, p. 123–136, 2000.

BEGON, M.; TOWNSEND, C.; HARPER, J. **Ecology: From Individuals to Ecosystems**. 4 ed. Hoboken: Blackwell Publishing, 2006. 738 p.

BELOVA, M. Microbial decomposition of freshwater macrophytes in the littoral zone of lakes. **Hydrobiologia**, v. 251, n. 1-3, p. 59–64, 1993.

BENGTSSON, G. Interactions between fungi, bacteria and beech leaves in a stream microcosm. **Oecologia**, v. 89, n. 4, p. 542–549, 1992.

BENGTSSON, S. et al. Acidogenic fermentation of industrial wastewaters: Effects of chemostat retention time and pH on volatile fatty acids production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, n. 3, p. 492–499, 2008.

BERGOLD, A. M, GEORGIADS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: Uma revisão new antifungic drugs: a review. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 2, p. 159–172, 2004.

BEST, E. P. H. et al. Modeling submerged macrophyte growth in relation to underwater light climate: Modeling approaches and application potential. **Hydrobiologia**, v. 444, n. 1-3, p. 43–70, 2001.

BIANCHINI JÚNIOR, I. Aspectos do processo de decomposição nos ecossistemas aquáticos continentais. In: POMPEO, M. **Perspectivas na Limnologia do Brasil**. São Luis: Gráfica e Editora União, 1999. p. 21–43.

BIANCHINI JÚNIOR, I. et al. Implication of anaerobic and aerobic decomposition of *Eichhornia azurea* (Sw.) Kunth. on the carbon cycling in a subtropical reservoir. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 1, p. 100–110, 2014.

BIANCHINI JÚNIOR, I.; CUNHA-SANTINO, M. B. As rotas de liberação do carbono dos detritos de macrófitas aquáticas. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n.1, p. 20–29, 2008.

BIANCHINI JÚNIOR, I.; CUNHA-SANTINO, M. B.; PERET, A M. Oxygen demand during mineralization of aquatic macrophytes from an oxbow lake. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n.1, p. 61–67, 2008.

BIANCHINI JÚNIOR, I.; PACOBAHYBA, L. D.; CUNHA-SANTINO, M. B. Aerobic and anaerobic decomposition of *Montrichardia arborescens* (L.) Schott. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 14, n. 3, p.27-34, 2002.

BIANCHINI JÚNIOR, I.; PERET, A. M.; CUNHA-SANTINO, M. B. A mesocosm study of aerobic mineralization of seven aquatic macrophytes. **Aquatic Botany**, v. 85, n. 2, p. 163–167, 2006.

BITAR, A. L. **Mineralização e formação de gases da degradação de *Eichhornia azurea* Kunth e *Egeria najas* Planch.** 2003. 119 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

BITAR, A. L.; BIANCHINI, JÚNIOR, I. Mineralisation assays of some organic resources of aquatic systems. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4A, p. 557–564, 2002.

BORGHI, A. A.; PALMA, M. S. A. Tetracycline: production, waste treatment and environmental impact assessment. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 1, p. 25–40, 2014.

BORNETTE, G.; PUIJALON, S. Macrophytes: ecology of aquatic plants. In: **Encyclopedia of Life Sciences (ELS)**. Chichester: John Wiley & Sons, 2009. p. 1–9.

BOSCHKER, H. T. S.; DE BROUWER, J. F. C.; CAPPENBERG, T. E. The contribution of macrophyte-derived organic matter to microbial biomass in salt-marsh sediments: Stable carbon isotope analysis of microbial biomarkers. **Limnology and Oceanography**, v. 44, n. 2, p. 309–319, 1999.

BOSSCHE, V. H.; ENGELEN, M.; ROCHETTE, F. Antifungal agents of use in animal health-chemical, biochemical and pharmacological aspects. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 26, n. 1975, p. 5–29, 2003.

BOUND, J. P.; VOULVOULIS, N. Pharmaceuticals in the aquatic environment - A comparison of risk assessment strategies. **Chemosphere**, v. 56, n. 11, p. 1143–1155, 2004.

BOXALL, A. B. A. The environmental side effects of medication. **EMBO reports**, v. 5, n. 12, p. 1110–1116, 2004.

BRASIL - Ministério da Agricultura. **Produtividade agrícola do Brasil cresce mais do que a mundial. 25/01/2012.** Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/politica-agricola/noticias/2012/01/produtividade-agricola-do-brasil-cresce-mais-do-que-a-mundial>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

BRITO, N. M. Validação de métodos analíticos: estratégias e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.



- BRODERSEN, D. E. et al. The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B, on the 30S ribosomal subunit. **Cell**, v. 103, n. 7, p. 1143–1154, 2000.
- CALAMARI, D. et al. Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and lambro in Northern Italy. **Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 7, p. 1241–1248, 2003.
- CARVALHO, F. T. et al. Análise temporal do crescimento vegetativo de *Egeria najas* a partir de fragmentos da planta. **Planta Daninha**, v. 21, n. spe, p. 101-104, 2003.
- CARVALHO, P.; THOMAZ, S. M.; BINI, L. M. Effects of temperature on decomposition of a potential nuisance species: the submerged aquatic macrophyte *Egeria najas* Planchon (Hydrocharitaceae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 65, n. 1, p. 51–60, 2005.
- CASTILLO, L. E. et al. Pesticide residues in the aquatic environment of banana plantation areas in the North Atlantic zone of Costa Rica. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, n. 8, p. 1942–1950, 2000.
- CAVALHEIRO, F. et al. Propostas preliminares referentes ao plano de zoneamento e manejo da Estação Ecológica do Jataí. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. III, n. 2, p. 951-968, 1990.
- CELIZ, M. D.; TSO, J.; AGA, D. S. Pharmaceutical metabolites in the environment: analytical challenges and ecological risks. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 12, p. 2473–2484, 2009.
- CHOPRA, I. New developments in tetracycline antibiotics: Glycylcyclines and tetracycline efflux pump inhibitors. **Drug Resistance Updates**, v. 5, n. 3-4, p. 119–125, 2002.
- CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 2, p. 232–260, 2001.
- CHEN, Y. et al. Effects of dissolved oxygen on extracellular enzymes activities and transformation of carbon sources from plant biomass: Implications for denitrification in constructed wetlands. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 2433–2440, 2011.
- CHENXI, W.; SPONGBERG, A. L.; WITTER, J. D. Determination of the persistence of pharmaceuticals in biosolids using liquid-chromatography tandem mass spectrometry. **Chemosphere**, v. 73, n. 4, p. 511–518, 2008.
- CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 2, p. 232–260, 2001.

CHRISTENSEN, A. M.; INGERSLEV, F.; BAUN, A. Ecotoxicity of mixtures of antibiotics used in aquacultures. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 8, p. 2208–2215, 2006.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico : Norma Aprovada (Norma M7-A6)**. ANVISA, 2003. v. 23. 57 p.

COLAIZZI, J. L.; KLINK, P. R. pH-Partition behavior of tetracyclines. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 58, n. 27, p. 1184–1189, 1969.

COOK, C. D. K. The number and kinds of embryo-bearing plants which have become aquatic: a survey. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 2, n. 1, p. 79–102, 1999.

COOK, C. D. K.; URMI-KÖNIG, K. A Revision of the Genus *Egeria* (Hydrocharitaceae). **Aquatic Botany**, v. 19, n. 1-2, p. 73–96, 1984.

CÓRDOVA-KREYLOS, A. L.; SCOW, K. M. Effects of ciprofloxacin on salt marsh sediment microbial communities. **The ISME Journal**, v. 1, n. 7, p. 585–595, 2007.

CORRÊA, M.; VELINI, E.; ARRUDA, D. Composição Química e Bromatológica de *Egeria densa*, *Egeria najas* e *Ceratophyllum demersum*. **Planta Daninha**, v. 21, n. 1, p. 7–13, 2003.

COSTANZO, S. D.; MURBY, J.; BATES, J. Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 51, n.1, p. 218–223, 2005.

CUNHA-SANTINO, M. B.; BIANCHINI JÚNIOR, I. The aerobic and anaerobic decomposition of *Typha domingensis* Pers. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 18, n. 3, p. 321–334, 2006.

CUNHA-SANTINO, M. B.; BIANCHINI JÚNIOR, I. Humificação E Mineralização De Macrófitas Aquáticas: Uma Revisão Sobre Esses Processos. **Oecologia Australis**, v. 13, n. 4, p. 665–676, 2009.

CUNHA-SANTINO, M. B.; BIANCHINI JÚNIOR, I. Effects of detritus chemical composition on the anaerobic mineralization of *Salvinia auriculata* and *Utricularia breviscapa*. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 27, n. 2, p. 202-212, 2015.

CUNHA-SANTINO, M. B.; BIANCHINI JÚNIOR, I.; OKAWA, M. H. The fate of *Eichhornia azurea* (Sw.) Kunth. detritus within a tropical reservoir. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 22, n. 2, p. 109–121, 2010.

CUNHA-SANTINO, M. B.; SCIESSERE, L.; BIANCHINI JÚNIOR, I. As atividades das enzimas na decomposição da matéria orgânica particulada em ambientes aquáticos continentais. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 1, p. 30–41, 2008.

CVMP - Committee For Veterinary Medicinal Products. Oxytetracycline, Tetracycline, Chlortetracycline: Summary Report (3). **Ref. EMEA/MRL/023/95**, n. 3, p. 5–6, 1995.

DAUGHTON, C. G.; TERNES, T. A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? **Environmental Health Perspectives**, v. 107, n. 6, p. 907–938, 1999.

DAVIS, S. E. et al. Temporally dependent C, N, and P dynamics associated with the decay of *Rhizophora mangle* L. leaf litter in oligotrophic mangrove wetlands of the Southern Everglades. **Aquatic Botany**, v. 75, n. 3, p. 199–215, 2003.

DE ALMEIDA, W. B.; DOS SANTOS, H. F.; ZERNER, M. C. A theoretical study of the interaction of anhydrotetracycline with Al (III). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, n. 9, p. 1101–1108, 1998.

DE LEIJ, F. A. A. M.; WHIPPS, J. M.; LYNCH, J. The use of bacterial colony development for the characterization of bacterial communities in soil and roots. **Microbial Ecology**, v. 27, n. 1, p. 81–97, 1994.

DING, C.; HE, J. Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 925–941, 2010.

DOI, A.; STOSKOPF, M. The kinetics of oxytetracycline degradation in deionized water under varying temperature, pH, light, substrate, and organic matter. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 12, n. 3, p. 246–253, 2000.

DUÓ, M. P. **Balço de carbono e atividade enzimática na decomposição aeróbia e aaeróbia de três macrófitas aquaáticas em diferentes temperaturas**. 2014. 142 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

DZIDIC, S.; SUSKOVIC, J.; KOS, B. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 11–21, 2008.

ENGELHARDT, K. A; RITCHIE, M. E. Effects of macrophyte species richness on wetland ecosystem functioning and services. **Nature**, v. 411, n. 6838, p. 687–689, 2001.

ESPINOZA, C. et al. Degradation of a veterinary pharmaceutical product in water by electro-oxidation using a BDD anode. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 59, n. 2, p. 2507–2511, 2014.

ESTEVEES, F. **Fundamentos de Limnologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1998. 602 p.

FAN, C. et al. Influence of trace erythromycin and erythromycin-H<sub>2</sub>O on carbon and nutrients removal and on resistance selection in sequencing batch reactors (SBRs). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n.1, p. 185–195, 2009.

- FERREIRA-PERUQUETTI, P. S.; FONSECA-GESSNER, A. A. Comunidade de Odonata (Insecta) em áreas naturais de Cerrado e monocultura no nordeste do Estado de São Paulo, Brasil: relação entre o uso do solo e a riqueza faunística. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 20, n. 2, p. 219–224, 2003.
- FIGUEROA, R. A.; LEONARD, A.; MACKAY, A. A. Modeling tetracycline antibiotic sorption to clays. **Environmental Science and Technology**, v. 38, n. 2, p. 476–483, 2004.
- FLEISS, J. L. **The Design and Analysis of Clinical Experiments**. Hoboken: John Wiley and Sons, 1986.
- FLYNN, K. J. The concept of “primary production” in aquatic ecology. **Limnology and Oceanography**, v. 33, n. 5, p. 1215–1216, 1988.
- FONSECA, A. L. D. S. et al. Cinética da decomposição aeróbia na fase de lixiviação dos detritos vegetais alóctones. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 26, n. 1, p. 89–97, 2014.
- FUENTES, M. et al. Application of two anaerobic digestion models to biofilm systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, n. 2, p. 259–269, 2008.
- FUNDAÇÃO FLORESTAL. **Sobre a Estação**. Disponível em: <<http://www.ambiente.sp.gov.br/e-e-jatai/sobre-a-estacao/>>. Acesso em: 12 mar. 2015.
- FUHRMAN, J. A. Microbial community structure and its functional implications. **Nature**, v. 459, n. 7244, p. 193–199, 2009.
- GAGNÉ, F.; BLAISE, C.; ANDRÉ, C. Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, n. 3, p. 329–336, 2006.
- GALVÃO, L. M. Regiões bioclimáticas do Brasil. **Revista Brasileira de Geografia**, v. 29, p. 3–36, 1976.
- GARCIA-RODRÍGUEZ, A. et al. The influence of light exposure, water quality and vegetation on the removal of sulfonamides and tetracyclines: A laboratory-scale study. **Chemosphere**, v. 90, n. 8, p. 2297–2302, 2013.
- GESSNER, M. O.; CHAUVET, E. Importance of stream microfungi in controlling breakdown rates of leaf litter. **Ecology**, v. 75, n. 6, p. 1807–1817, 1994.
- GESSNER, M. O.; CHAUVET, E. A case for using litter breakdown to assess functional stream integrity. **Ecological Applications**, v. 12, n. 2, p. 498–510, 2002.
- GIMENES, K. Z. **Aspectos cinéticos da degradação aeróbia e anaeróbia de *Cyperus giganteus*, *Eichhornia azurea* e *Egeria najas* da Lagoa do Óleo (Estação Ecológica do Jataí, Luiz Anônio, SP)**. 2011. 150 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

GIMENES, K. Z.; CUNHA-SANTINO, M. B.; BIANCHINI JÚNIOR, I. Cellulase activity in anaerobic degradation of aquatic macrophytes tissues. **Fundamental and Applied Limnology / Archiv für Hydrobiologie**, v. 183, n. 1, p. 27–39, 2013.

GISI, U. Assessment of selection and resistance risk for demethylation inhibitor fungicides in *Aspergillus fumigatus* in agriculture and medicine: A critical review. **Pest Management Science**, v. 70, n. 3, p. 352–364, 2014.

GODSHALK, G. L.; WETZEL, R. G. Decomposition of aquatic angiosperms. II. Particulate components. **Aquatic Botany**, v. 5, n. 4, p. 301–327, 1978.

GÖBEL, A. et al. Fate of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in different wastewater treatment technologies. **Science of the Total Environment**, v. 372, n. 2–3, p. 361–371, 2007.

GÓMEZ, M. J. et al. Spatio-temporal evaluation of organic contaminants and their transformation products along a river basin affected by urban, agricultural and industrial pollution. **Science of the Total Environment**, v. 420, p. 134–145, 2012.

GRANADOS, M. et al. Determination of tetracyclines in water samples using liquid chromatography with fluorimetric detection. **Chromatographia**, v. 61, n. 9, p. 471–477, 2005.

GRIFFITHS, R. I. et al. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA - based microbial community composition. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5488–5491 2000.

GUERESCHI, R. M. **Macroinvertebrados bentônicos em córregos da Estação Ecológica do Jataí, Luiz Antônio, SP: subsídio para monitoramento ambiental**. 2004. 82 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Ciências Biológicas e Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

GULIS, V.; SUBERKROPP, K. Interactions between stream fungi and bacteria associated with decomposing leaf litter at different levels of nutrient availability. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 30, n. 2, p. 149–157, 2003.

HALLING-SØRENSEN, B. et al. Occurrence, fate and effects of pharmaceuticals substance in the environment - A review. **Chemosphere**, v. 36, n. 2, p. 357–393, 1998.

HALLING-SØRENSEN, B.; SENDELØV, G.; TJØRNELUND, 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, n. 3, p. 263–271, 2002.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A.; RYAN, P. D. **PAST: paleontological statistics software package for education, and data analysis**. Palaeontologia Electronica, 2001. Disponível em: <[palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)>. Acesso em: 19 jan. 2015.

HARRISON, P. G.; MANN, K. H. Detritus formation from eelgrass (*Zostera marina* L.): The relative effects of fragmentation, leaching, and decay. **Limnology and Oceanography**, v. 20, n. 6, p. 924–934, 1975.

HEBERER, T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. **Toxicology Letters**, v. 131, n. 1-2, p. 5–17, 2002.

HERNÁNDEZ, M.; BORRULL, F.; CALULL, M. Analysis of antibiotics in biological samples by capillary electrophoresis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 03, p. 416–427, 2003.

HILL, B. H.; PERROTTE, W. T. Microbial colonization, respiration, and breakdown of maple leaves along a stream-marsh continuum. **Hydrobiologia**, v. 312, n. 1, p. 11–16, 1995.

HIRSCH, R. et al. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. **Science of the Total Environment**, v. 225, n. 1-2, p. 109–118, 1999.

HU, J. Y. et al. Adsorptive characteristics of ionogenic aromatic pesticides in water on powdered activated carbon. **Water Research**, v. 32, n. 9, p. 2593–2600, 1998.

HU, X.; ZHOU, Q.; LUO, Y. Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 9, p. 2992–2998, 2010.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico. **Brasil/ Ministério do Planejamento Orçamento e Gestão**, 2008. 173 p.

IFPMA - INTERNATIONAL FEDERATION OF PHARMACEUTICAL MANUFACTURES E ASSOCIATIONS. The pharmaceutical industry and global health: facts and figures. **IFPMA**, 2011. 95 p.

IMS - INSTITUTE FOR HEALTHCARE INFORMATICS. The Global Use of Medicines : Outlook Through 2016. **IMS**, 2012. 108 p.

INGERSLEV, F. et al. Primary biodegradation of veterinary antibiotics in aerobic and anaerobic surface water simulation systems. **Chemosphere**, v. 44, n. 4, p. 865–872, 2001.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia Qualidade e Tecnologia. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGRE-008**, 2003. 20 p.

JONES, J. **A guide to methods for estimation microbial numbers and biomass in fresh water**. 39. ed. Ambleside: Freshwater Biological Association, 1979. 112 p.

JONES-LEPP, T. L. Pharmaceuticals and Hormones in the Environment. In: MEYERS, R. A. **Encyclopedia of analytical chemistry**. Hoboken: John Wiley and Sons, 2009. p. 1–59

- KAUSHIK, N.; HYNES, H. The fate of the dead leaves that fall into streams. **Archives of Hydrobiology**, v. 68, p. 465–515, 1971.
- KING, R. S. Biotransformations in Drug Metabolism. In: NASSAR, A. F. **Drug Metabolism Handbook**. Hoboken: John Wiley and Sons, 2009. p. 17-40.
- KIM, S. C.; CARLSON, K. Temporal and spatial trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in aqueous and river sediment matrices. **Environmental Science and Technology**, v. 41, n. 1, p. 50–57, 2007.
- KOLPIN, D. W. et al. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. **Environmental Science and Technology**, v. 36, n. 6, p. 1202–1211, 2002.
- KOTZERKE, A. et al. Alterations in soil microbial activity and N-transformation processes due to sulfadiazine loads in pig-manure. **Environmental Pollution**, v. 153, n.2, p. 315–322, 2008.
- KULSHRESTHA, P.; GIESE, R. F.; AGA, D. S. Investigating the molecular interactions of oxytetracycline in clay and organic matter: Insights on factors affecting its mobility in soil. **Environmental Science and Technology**, v. 38, n. 15, p. 4097–4105, 2004.
- KÜMMERER, K. Resistance in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 311–320, 2004.
- KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I. **Chemosphere**, v. 75, n. 4, p. 417–434, 2009a.
- KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part II. **Chemosphere**, v. 75, n. 4, p. 435–441, 2009b.
- KURYLOWICZ, W. **Antibióticos: Uma Revisão Crítica**. Recife: Editora Universitária Universidade Federal de Pernambuco, 1981. 341 p.
- LARSSON, D. G. J. Pollution from drug manufacturing: review and perspectives. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 369, n. 1656, p. 1–7, 2014.
- LEAL, R. M. P. et al. Occurrence and sorption of fluoroquinolones in poultry litters and soils from São Paulo State, Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 432, n. 2, p. 344–349, 2012.
- LEVY, S. B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine**, v. 10, n. 12, p. S122–S129, 2004.
- LIN, Y. F. et al. Effects of macrophytes and external carbon sources on nitrate removal from groundwater in constructed wetlands. **Environmental Pollution**, v. 119, n. 3, p. 413–420, 2002.
- LINDEMAN, E. The trophic-dynamic aspect of ecology. **Ecology**, v. 23, n. 4, p. 399–417, 1942.

- MADIGAN, M. T. et al. **Brock Biology of Microorganisms**. 12. ed. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings, 2009. 1061 p.
- MAKI, J. S. et al. Recovery and diversity of heterotrophic bacteria from chlorinated drinking waters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 1047–1055, 1986.
- MAMANI, M.; REYES, F.; RATH, S. Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD. **Food Chemistry**, v. 117, n. 3, p. 545–552, 2009.
- MAIA, P. P. et al. Residue content of oxytetracycline applied on tomatoes grown in open field and greenhouse. **Food Control**, v. 20, n. 1, p. 11–16, 2009.
- MARANO, A. V. et al. Diversity, role in decomposition, and succession of zoosporic fungi and straminipiles on submerged decaying leaves in a woodland stream. **Hydrobiologia**, v. 659, n. 1, p. 93–109, 2011.
- MARTINS, D. et al. Caracterização genética de acesso de egeria (*Egeria* spp.) coletados no estado de São Paulo Utilizando RAPD. **Planta Daninha**, v. 21, n. spe, p. 1–6, 2003.
- MASSEY, L.; POHLAND, F. Phase separation of anaerobic stabilization by kinetic controls. **Water Pollution Control Federation**, v. 50, n. 9, 1978.
- MAUL, J. D. et al. Effects of the antibiotic ciprofloxacin on stream microbial communities and detritivorous macroinvertebrates. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 6, p. 1598–1606, 2006.
- MCMURRY, L. M. et al. Active uptake of tetracycline by membrane vesicles from susceptible *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 20, n. 3, p. 307–313, 1981.
- MENEAU, I.; SANGLARD, D. Azole and fungicide resistance in clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates. **Medical Mycology: Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 43, n. 1, p. S307–S311, 2005.
- MORI, E. S. Caracterização genética de populações de *Egeria najas* presentes no reservatório de Jupia e rios afluentes. **Planta Daninha**, v. 17, n. 2, p. 217–225, 1999.
- MORRIS, J. T. et al. Responses of coastal wetlands to rising sea level. **Ecology**, v. 83, n. 10, p. 2869, 2002.
- NAKAI, S. et al. Growth inhibition of blue-green algae by allelopathic effects of macrophytes. **Water Science and Technology**, v. 39, n. 8, p. 47–53, 1999.
- NÄSLUND, J.; HEDMAN, J. E.; AGESTRAND, C. Effects of the antibiotic ciprofloxacin on the bacterial community structure and degradation of pyrene in marine sediment. **Aquatic Toxicology**, v. 90, n. 3, p. 223–227, 2008.



- NOBRE, M. D. O. et al. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. **Ciência Rural**, v. 32, n. 1, p. 175–184, 2002.
- NÜBEL, U. et al. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 19, p. 5636–5643, 1996.
- PARK, S.; CHO, K. Nutrient leaching from leaf litter of emergent macrophyte (*Zizania latifolia*) and the effects of water temperature on the leaching process. **Korean Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 4, p. 289–294, 2003.
- PAROLO, M. E. et al. Tetracycline adsorption on montmorillonite: pH and ionic strength effects. **Applied Clay Science**, v. 40, n. 1-4, p. 179–186, 2008.
- PARSONS, W.; TAYLOR, B.; PARKINSON, D. Decomposition of aspen (*Populus tremuloides*) leaf litter modified by leaching. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 20, p. 943–951, 1990.
- PAULA, G. N. DE. Os desafios da indústria farmacêutica global e o redesenho do negócio pela Merck. **Revista de Administração de Empresas**, v. 41, n. 1, p. 76–87, 2001.
- PEREIRA-MAIA, E. C. et al. Tetraciclina e glicilciclina: uma visão geral. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 700–706, 2010.
- PEREIRA-SILVA, E. F. L. et al. Avaliação da qualidade da água em microbacias hidrográficas de uma Unidade de Conservação do Nordeste do estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 3, p. 371-381, 2011.
- PERET, A.; BIANCHINI JÚNIOR, I. Stoichiometry of aerobic mineralization (O/C) of aquatic macrophytes leachate from a tropical lagoon (São Paulo - Brazil). **Hydrobiologia**, v. 528, n. 1, p. 167–178, 2004.
- PEROBELLI, F. S. et al. Produtividade do setor agrícola brasileiro (1991-2003). **Nova Economia**, v. 17, n. 1, p. 65–91, 2007.
- PETERSEN, R. C.; CUMMINS, K. W. Leaf processing in a woodland stream. **Freshwater Biology**, v. 4, n. 247, p. 343–368, 1974.
- PIRES, A. Z. C. R. **Elaboração de um banco de dados georeferenciados como subsídio ao Planejamento e Manejo de uma unidade de conservação– Estação Ecológica do Jataí (Luiz Antonio São Paulo)**. 1994. 62 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- PORTNER, D.; NEWELL, S. Y.; LINGLE, W. L. Tunneling bacteria in decaying leaves of a seagrass. **Aquatic Botany**, v. 35, n. 3-4, p. 395–401, 1989.
- POULIQUEN, H. et al. Comparative hydrolysis and photolysis of four antibacterial agents (oxytetracycline oxolinic acid, flumequine and florfenicol) in deionised water,

freshwater and seawater under abiotic conditions. **Aquaculture**, v. 262, n. 1, p. 23–28, 2007.

POULIQUEN, H.; LE BRIS, H.; PINAULT, L. Experimental study on the decontamination kinetics of seawater polluted by oxytetracycline contained in effluents released from a fish farm located in a salt-marsh. **Aquaculture**, v. 112, n. 2-3, p. 113–123, 1993.

POTT, V. J.; POTT, A. **Plantas aquáticas do Pantanal**. Brasília: Embrapa, 2000. 404 p.

PRESS, W. H. et al. **Numerical recipes in C: the art of scientific computing**. New York: Cambridge University Press, 1993. 994 p.

QUINTÃO, J. M. B.; REZENDE, R. S.; GONÇALVES JÚNIOR, J. F. Microbial effects in leaf breakdown in tropical reservoirs of different trophic status. **Freshwater Science**, v. 32, n. 3, p. 933–950, 2013.

RASCIO, N. The underwater life of secondarily aquatic plants: Some problems and solutions. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 21, n. 4, p. 401–427, 2002.

RAVEN, P.; EVERT, R.; EICHHORN, S. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906 p.

REGITANO, J. B.; LEAL, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 34, n. 1, p. 601–616, 2010.

REJMÁNKOVÁ, E.; SIROVÁ, D. Wetland macrophyte decomposition under different nutrient conditions: relationships between decomposition rate, enzyme activities and microbial biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 526–538, 2007.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RICKLEFS, R. **A Economia da Natureza**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 503 p.

ROBERTS, D. E.; CHURCH, A. G.; CUMMINS, S. P. Invasion of *Egeria* into the Hawkesbury-Nepean River, Australia. **Journal of Aquatic Plant Management**, v. 37, p. 31–34, 1999.

ROCHETTE, F.; ENGELEN, M.; BOSSCHE, V. H. Antifungal agents of use in animal health - practical applications. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 26, n. 1, p. 31–53, 2003.

RODRIGUES, M. H. S. **Estudo da fauna de Chironomidae (diptera) dos sedimetnos na represa do Beija-Flor, na Estação Ecológica do Jataí, Luíz Antônio, SP**. 1997. 85 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

RODRIGUES, R. B.; DETTKE, G. A.; MONTANHER, D. R. Anatomia de espécies dos gêneros *Egeria Planch.* e *Hydrilla Rich.* (Hydrocharitaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 1, p. 360–362, 2007.

SACHER, F. et al. Pharmaceuticals in groundwaters: analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Wurttemberg, Germany. **Journal of Chromatography A**, v. 938, n. 1-2, p. 199–210, 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCHI, E.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 2028 p.

SANDERSON, H. et al. Dissipation of oxytetracycline, chlortetracycline, tetracycline and doxycycline using HPLC-UV and LC/MS/MS under aquatic semi-field microcosm conditions. **Chemosphere**, v. 60, n. 5, p. 619–629, 2005.

SANTAMARÍA, L. Why are most aquatic plants widely distributed? Dispersal, clonal growth and small-scale heterogeneity in a stressful environment. **Acta Oecologica**, v. 23, n. 3, p. 137–154, 2002.

SANTOS, J. E.; PIRES, A. M. Z. C. R.; PIRES, J. S. R. **Caracterização ambiental de uma unidade de conservação. Estação Ecológica do Jataí, Luiz Antônio, SP**. São Carlos: Instituto Florestal do Estado de São Paulo, 2000. Disponível em: <[http://www.lapa.ufscar.br/pdfcaracterizacao\\_ambiental\\_de\\_uma\\_unidade\\_de\\_conservacao.pdf](http://www.lapa.ufscar.br/pdfcaracterizacao_ambiental_de_uma_unidade_de_conservacao.pdf)>. Acesso em: 02 nov. 2013.

SÃO PAULO. **Cerrado: Bases para conservação e uso sustentável das áreas de cerrado do Estado de São Paulo**. São Paulo: Secretaria do Estado do Meio Ambiente, 1997. 113 p.

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, n. 5, p. 725–759, 2006.

SAWYER, C. N.; MCCARTY, P. L.; PARKIN, G. F. **Chemistry for Environmental Engineering and Science**. 5. ed. McGraw-Hill Higher Education, 2003. 752 p.

SCHNAPPINGER, D.; HILLEN, W. Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. **Archives of Microbiology**, v. 165, n. 6, p. 359–369, 1996.

SCIESSERE, L. **Ação das enzimas extracelulares na dinâmica da decomposição de macrófitas aquáticas**. 2011. 87 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

SEDELL, J.; RICHEY, J.; SWANSON, F. The river continuum concept: a basis for the expected ecosystem behavior of very large rivers? **Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 106, p. 49–55, 1989.

SHERR, E.; SHERR, B. Role of microbes in pelagic food webs: A revised concept. **Limnology and Oceanography**, v. 33, n. 5, p. 1225–1227, 1988.

SILVA, D. S. et al. The decomposition of aquatic macrophytes: bioassays versus in situ experiments. **Hydrobiologia**, v. 665, n. 1, p. 219-227, 2011.

SILVA, S.; IZABEL, T.; GUSMÃO, L. Fungos conidiais associados a substratos vegetais submersos em algumas áreas do bioma Caatinga. **Rodriguésia**, v. 65, n. 2, p. 527-538, 2014.

SMOCK, L. A; STONEBURNER, D. L. The response of macroinvertebrates to aquatic macrophyte decomposition the response of macroinvertebrates to aquatic macrophyte decomposition. **Oikos**, v. 35, n. 3, p. 397-403, 1980.

SONG, N. et al. Effect of temperature on submerged macrophyte litter decomposition within sediments from a large shallow and subtropical freshwater lake. **Hydrobiologia**, v. 714, n. 1, p. 131-144, 2013.

SPEER, B. S.; SHOEMAKER, N. B.; SALYERS, A. A. Bacterial resistance to tetracycline: Mechanisms, transfer, and clinical significance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, n. 4, p. 387-399, 1992.

STUMM, W.; MORGAN, J. **Aquatic Chemistry**. 3. ed. New York: Wiley Interscience, 1996. 1022 p.

SUN, X. et al. PdCYP51B, a new putative sterol 14  $\alpha$ -demethylase gene of *Penicillium digitatum* involved in resistance to imazalil and other fungicides inhibiting ergosterol synthesis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 4, p. 1107-1119, 2011.

TANG, J. et al. The occurrence and distribution of antibiotics in Lake Chaohu, China: Seasonal variation, potential source and risk assessment. **Chemosphere**, v. 122, p. 154-161, 2015.

TAYLOR, B. R.; BÄRLOCHER, F. Variable effects of air-drying on leaching losses from tree leaf litter. **Hydrobiologia**, v. 325, n. 3, p. 173-182, 1996.

THIELE-BRUHN, S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils - A review. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 166, n. 2, p. 145-167, 2003.

THIELE-BRUHN, S.; BECK, I. C. Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass. **Chemosphere**, v. 59, n. 4, p. 457-465, 2005.

THOMAZ, S. M. Fatores ecológicos associados à colonização e ao desenvolvimento de macrófitas aquáticas e desafios de manejo. **Planta Daninha**, v. 20, n. spe, p. 21-33, 2002.

THOMAZ, S. M.; BINI, L. M. Ecologia e manejo de macrófitas aquáticas em reservatórios. **Acta Limnológica Brasiliensia**, v. 10, n. 1, p. 103-116, 1998.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

THULLEN, J. S. et al. Macrophyte decomposition in a surface-flow ammonia-dominated constructed wetland: Rates associated with environmental and biotic variables. **Ecological Engineering**, v. 32, n. 3, p. 281–290, 2008.

TOLLS, J. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: A review. **Environmental Science and Technology**, v. 35, n. 17, p. 3397–3406, 2001.

TOMBOSI, L. R. Análise da paisagem no entorno de três unidades de conservação: subsídios para a criação da zona de amortecimento. 2008. 86 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

TOPP, E. et al. Runoff of pharmaceuticals and personal care products following application of biosolids to an agricultural field. **Science of the Total Environment**, v. 396, n 1, p. 52–59, 2008.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **R.E.D. FACTS - Imazalil**. USEPA, 2005. 7 p. Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/REDS/factsheets/2325fact.pdf>> Acesso em: 21 jan. 2014.

USFDA ERA. Environmental assessment - Oxytet soluble (oxytetracycline hydrochloride soluble powder). **I.D. Russell Company, Laboratories**, v. 9, pp. 368–379, 1989.

VÄHÄTALO, A. V.; SONDERGAARD, M. Carbon transfer from detrital leaves of eelgrass (*Zostera marina*) to bacteria. **Aquatic Botany**, v. 73, n. 3, p. 265–273, 2002.

VALIELA, I. et al. Decomposition in salt marsh ecosystems: The phases and major factors affecting disappearance of above-ground organic matter. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 89, n. 1, p. 29–54, 1985.

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

VANNOTE, R. et al. The river continuum concept. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 37, n. 1, p. 130–137, 1980.

VIDAL, L. et al. Caminhos do Carbono em Ecossistemas Aquáticos Continentais. In: ROLAND, F.; CESAR, D.; MARINHO, M. **Lições de Limnologia**. São Carlos: Rima, 2005. p. 193–208.

VYMAZAL, J. Emergent plants used in free water surface constructed wetlands: A review. **Ecological Engineering Part B**, v. 61, p. 582–592, 2013.

WALSH, C. **Antibiotics Actions, Origins, Resistance**. Washington: ASM Press, 2003. 335 p.

WANG, S. et al. Effect of oxytetracycline on performance and microbial community of an anoxic – aerobic sequencing batch reactor treating mariculture wastewater. **RSC Advances**, v. 5, p. 53893–53904, 2015.

- WEBER, K. P. et al. Effect of ciprofloxacin on microbiological development in wetland mesocosms. **Water Research**, v. 45, n. 10, p. 3185–3196, 2011.
- WEBSTER, J. R.; BENFIELD, E. F. Vascular plant breakdown in freshwater ecosystems. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 17, p. 567–594, 1986.
- WESTERGAARD, K. et al. Effect of tylosin as a disturbance on the soil microbial community. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, n. 15, p. 2061–2071, 2001.
- WILLIAMS, R. T. **Detoxication mechanisms: the metabolism of drugs and allied organic compounds**. London: Chapman and Hall, 1947. 288 p.
- WETZEL, R. **Limnology Lake and River Ecosystems**. 3. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2001. 1006 p.
- WETZEL, R. G. Death, detritus, and energy flow in aquatic ecosystems. **Freshwater Biology**, v. 33, n. 1, p. 83–89, 1995.
- XUAN, R. et al. Hydrolysis and photolysis of oxytetracycline in aqueous solution. **Journal of Environmental Science and Health. Part B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes**, v. 45, n. 1, p. 73–81, 2010.
- YANG, J. F. et al. Dissipation of oxytetracycline in soils under different redox conditions. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 10, p. 2704–2709, 2009.
- YING, G. G.; YU, X. Y.; KOOKANA, R. S. Biological degradation of triclocarban and triclosan in a soil under aerobic and anaerobic conditions and comparison with environmental fate modelling. **Environmental Pollution**, v. 150, n. 3, p. 300–305, 2007.
- ZHANG, L. H. et al. Comparing litter dynamics of *Phragmites australis* and *Spartina alterniflora* in a sub-tropical Chinese estuary: Contrasts in early and late decomposition. **Aquatic Botany**, v. 117, n. 1, p. 1–11, 2014.
- ZHAO, C. et al. Role of pH on photolytic and photocatalytic degradation of antibiotic oxytetracycline in aqueous solution under visible/solar light: Kinetics and mechanism studies. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 134-135, p. 83– 92, 2013
- ZHAO, X. et al. Remediation of pharmaceuticals and personal care products using an aerobic granular sludge sequencing bioreactor and microbial community profiling using Solexa sequencing technology analysis. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 104–112, 2015.
- ZUCCATO, E. et al. Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 179, n. 1-3, p. 1042–1048, 2010.