

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

Influência de compostos xenobiontes na densidade, diversidade e função ecológica bacteriana de degradação do agrotóxico fipronil

Zaryf Araji Dahroug Pacheco

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

São Carlos

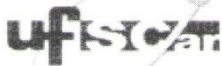
2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P116i Pacheco, Zaryf Araji Dahroug
Influência de compostos xenobiontes na densidade,
diversidade e função ecológica bacteriana de degradação
do agrotóxico fipronil / Zaryf Araji Dahroug Pacheco.
-- São Carlos : UFSCar, 2015.
56 p.

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

1. Oxitetraciclina. 2. Imazalil. 3. Fipronil. 4.
Diversidade bacteriana. 5. DGGE. I. Título.



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 Zaryf Araji Dahroug Pacheco, realizada em 13/06/2015:

Prof. Dra. Mirna Helena Regali Seleglim
UFSCar

Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza
UFSCar

Profa. Dra. Eny Maria Vieira
USP

Profa. Dra. Nelma Regina Segnini Bossolan
USP

Profa. Dra. Isabel Kimiko Sakamoto
USP

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de estudo concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio ao projeto (Processo no. 2013/02989-0).

Aos funcionários do PPG-ERN/ UFSCar João Augusto da Silva Affonso, Roseli Aparecida Gonçalves e Maria Elizabeth Guimarães Moreira pela paciência e por solucionarem todos os trâmites burocráticos relacionados a minha pós graduação.

Aos professores do PPG-ERN/ UFSCar pelas aulas ministradas que complementaram minha formação.

A Profa. Dra. Mirna Helena Regali Seleglim por ter aceitado me orientar, ter dedicado tempo e compartilhado conhecimento. Obrigada pelo apoio, companheirismo, confiança e por sempre apresentar muita serenidade na resolução dos problemas.

A Profa. Dra. Marcela Bianchessi da Cunha Santino e Prof. Dr. Irineu Bianchini Jr. pela colaboração nas análises de carbono.

A Profa. Dra. Eny Maria Vieira por ter aceitado colaborar com a realização deste trabalho de forma extremamente receptiva e acolhedora.

A Profa. Dra. Maria Bernadete A. Varesche por ter se interessado em fazer parte deste trabalho e ter compartilhado conhecimento e infraestrutura.

Ao Prof. Armando A. H. Vieira pela permissão do uso de equipamentos no laboratório.

Ao Dr. Carlos Alexandre Galinaro por compartilhar conhecimentos na área de química analítica.

A Dra. Isabel Kimiko Sakamoto pela atenção, dedicação e por ter viabilizado as análises moleculares deste trabalho.

Ao técnico Luiz Aparecido Joaquim por ter colaborado com os trabalhos de campo e compartilhado conhecimento ecológicos de extrema relevância.

Aos colegas do Laboratório de Ecologia de Microrganismos Aquáticos por estarem presentes durante os quatro anos de doutorado, compartilhando bons momentos.

Aos colegas do Laboratório de Química Analítica, Ambiental e Ecotoxicologia por compartilharem equipamentos, conhecimento e com muita camaradagem terem me recebido no laboratório.

À Mara Rúbia, Fabrício e Elisa, por terem trazido tanta alegria e tantos bons momentos durante esses quatro anos em São Carlos.

Aos meus novos amigos da UNEMAT, Eli, Stenio, Raphaella, Akikazu, Anez e Bessa por me receberem tão bem nessa nova etapa da minha vida profissional e por terem encontrado um espacinho pra mim na vida pessoal de vocês. Estar em Tangará da Serra é mais feliz por ter vocês por perto.

Às “Luluzinhas” Inaê, Fernanda, Ju Kurokawa, Debi e Lais por tantas histórias, momentos bons e amizade sincera.

Às minhas amigas Juliana Kawanishi e Karen Campos, amizade que levo comigo há tantos anos e que é essencial em minha vida. Amo vocês!

À família Reis (Marina, Pedro, André, madrinha Cristina, padrinho Luiz e princesa Lis), minha família de coração, por sempre fazerem eu me sentir acolhida, amada. É bom saber que posso contar com vocês e compartilhar angústias felicidades e sonhos.

À Elismary Renata, amiga querida, mais antiga, por quem sinto muito amor. Obrigada por fazer parte da minha vida por tantos anos

À Edna Lopes Hardoim, pela orientação profissional nos meus primeiros anos acadêmicos e pela amizade verdadeira desde então. Serei sempre grata e feliz por te ter em minha vida.

À vó Emely, Dona Jane, Tia Rosane, Seu Edson, Solange e Camile e Aline por estenderem meu conceito de família, por permitirem que eu faça parte de suas vidas e por compartilharem comigo todos os momentos da minha vida.

À Helena Janke, por ter me ajudado a amadurecer, por ter compartilhado seu imenso conhecimento e sua verdadeira amizade. Serei sempre grata a você pela realização deste trabalho e por ter sido feliz nesse período em São Carlos.

Ao meu pai Khaled Mohamad Dahroug, por quem sinto imensurável saudade e infinito amor. Gratidão pelos ensinamentos e pelo amor compartilhado durante os primeiros 15 anos da minha vida.

À minha mãe, Issaf Araji Dahroug, mulher forte, guerreira, que nunca mediu esforços para que eu alcançasse qualquer objetivo. Sempre será minha inspiração. Sem a senhora mãe, eu nada seria.

Aos meus irmãos Gilbert, Jean, Magyda, Oumar e Khadyge, por fazerem toda diferença em minha vida, por me completarem e serem aqueles com maior capacidade de me entender. Sinto-me honrada e feliz por ter vocês como irmãos.

Aos meus sobrinhos Yasmin, Khaled e Issan, por me trazerem tanta felicidade! Luzes da minha vida.

Ao meu marido Fernando Pacheco, quem sempre amarei. Obrigada por acreditar em mim, mesmo quando eu mesma descredita. Obrigada por trazer brilho aos meus dias, amor ao meu coração e paz a minha vida.

Dedicatória

Dedico esta tese a Issaf Araji Dahroug,
minha mãe, meu espelho e minha fortaleza.
A prova diária da existência do amor incondicional.

Resumo Geral

O atual sistema de produção agropecuário exige a utilização de produtos químicos como os antimicrobianos e agrotóxicos. Estes compostos, ao alcançarem os ambientes aquáticos, podem trazer sérios problemas ambientais e afetar vários organismos, como os microrganismos, que desempenham funções ecológicas fundamentais ao funcionamento ecossistêmico. Desta maneira, os objetivos deste trabalho foram: (I) avaliar a ação do bactericida oxitetraciclina (OTC) e fungicida imazalil (IMZ) na função ecológica bacteriana de degradação do agrotóxico fipronil; (II) avaliar o efeito da oxitetraciclina na densidade e diversidade bacteriana aquática; (III) acompanhar alterações na dinâmica bacteriana na presença do fipronil. Foi coletada água da Represa do Beija-Flor para a montagem dos experimentos. Foram preparados microcosmos em tréplica para seis tratamentos distintos: água; água e OTC; água e IMZ; água e fipronil; água, fipronil e OTC; água, fipronil e IMZ. Os microcosmos foram mantidos a 21 °C, no escuro. Foram feitas amostragens nos tempos 1, 5, 10, 20, 45 e 70 dias de incubação. Foram determinados o pH da água, carbono orgânico dissolvido (COD), nitrogênio total (NT) e as concentrações de OTC e fipronil. Amostras de água provenientes dos microcosmos foram utilizadas para análise bacteriana de densidade por microscopia de epifluorescência e análise de diversidade por meio dos perfis de bandas do DGGE. A presença da OTC sozinha e principalmente em mistura com IMZ, afeta a diversidade bacteriana, porém não causa efeito significativo na degradação do fipronil, sugerindo existência de redundância funcional entre os indivíduos que constituíram a comunidade bacteriana. A oxitetraciclina, em determinadas concentrações, causa a diminuição na densidade bacteriana e pode promover o aumento da diversidade, provavelmente por mediar a coexistência de espécies em consequência do controle do crescimento de bactérias mais competitivas. O fipronil pode causar o aumento da densidade bacteriana mas quanto à diversidade, no início do experimento, ela foi menor que nas amostras controle. Porém, após 70 dias, as diversidades ficam semelhantes, sugerindo que a comunidade se reestabeleceu, podendo esta ser considerada resiliente a perturbação causada pelo fipronil.

General Summary

The actual agricultural production system requires the use of chemicals such as pesticides and antimicrobials. These compounds, when reach aquatic environments, can cause serious environmental problems and affect target and non-target organisms such as microorganisms, that play key ecological functions to the ecosystem functioning. So, the objectives of this study were: (i) to evaluate the bactericidal action of oxytetracycline (OTC) and fungicide imazalil (IMZ) on bacterial ecological function of pesticide fipronil degradation; (II) evaluate the effect of oxytetracycline on density and aquatic bacterial diversity; (III) to monitor changes in bacterial dynamics in the presence of fipronil. Water was sampled in Beija-Flor Reservoir for mounting the experiments. Microcosms were prepared in triplicates for six different treatments: water; water and OTC; water and IMZ; water and fipronil; water, fipronil and OTC; water, fipronil and IMZ. The microcosms were kept in the dark at 21°C. Samples were collected at 1, 5, 10, 20, 45 and 70 days of incubation. It was determined the water pH, the dissolved organic carbon (DOC), total nitrogen (TN), OTC and fipronil concentrations. Water samples from the microcosms were also used for bacterial density analysis by epifluorescence microscopy and diversity by DGGE band profiles analysis. The presence of OTC alone and especially mixed with IMZ affects bacterial diversity, but does not cause significant effect on fipronil degradation, suggesting the existence of functional redundancy among the individuals that formed the bacterial community. The oxytetracycline, at certain concentrations, promotes a bacterial density decrease and diversity increase, probably by mediating the coexistence of species as a result of the growth control of the best competitive bacteria. Fipronil may cause bacterial density increase but, concerning its diversity, initially in the experiment, it was reduced, comparing with the control samples. However, after 70 days, the diversity was similar, suggesting that the community was reestablished, leading us to consider that the community was resilient to the impact caused by fipronil.

Lista de Figuras

Artigo 1

Figura 1 (a) Valores médios e desvios padrões do COD (mg L^{-1}) nos tratamentos T1(fipronil), T2 (fipronil+OTC), T3 (fipronil+IMZ) e T4 (fipronil+OTC+IMZ) durante os dias amostrais (1, 5, 10, 20, 45 e 70 dias) e (b) Análise de agrupamento do pH nos diferentes tratamentos.....8

Figura 2 (a) Valores médios e desvios padrões do NT (mg L^{-1}) nos tratamentos T1(fipronil), T2 (fipronil+OTC), T3 (fipronil+IMZ) e T4 (fipronil+OTC+IMZ) durante os dias amostrais (1, 5, 10, 20, 45 e 70 dias) e (b) Análise de similaridade do pH nos diferentes tratamentos.....8

Figura 3 (a) Valores médios e desvios padrões do pH nos tratamentos T1(fipronil), T2 (fipronil+OTC), T3 (fipronil+IMZ) e T4 (fipronil+OTC+IMZ) durante os dias amostrais (1, 5, 10, 20, 45 e 70 dias) e (b) Análise de agrupamento do pH nos diferentes tratamentos.....9

Figura 4 Análise de cluster (Correlação de Pearson, UPGMA) do perfil das bandas dos fragmentos do rRNA 16S para o Dominio Bacteria dos tempos de 1 e 70 dias nos tratamentos T1(fipronil), T2 (fipronil+OTC), T3 (fipronil+IMZ) e T4 (fipronil+OTC+IMZ).....10

Figura 5 Concentração de Fipronil nos tratamentos T1(fipronil), T2 (fipronil+OTC), T3 (fipronil+IMZ) e T4 (fipronil+OTC+IMZ) durante os dias (d) amostrais (1, 5, 10, 20, 45 e 70 dias).....11

Artigo 2

Figura 1 Concentração (mg L^{-1}) de fipronil em água dos microcosmos nos tempos amostrais (1, 5, 10, 20, 45 e 70 dias).....25

Figura 2 Valores médios e desvios padrões da densidade bacteriana aquática (cel mL^{-1}) controle e tratamento nos tempos de incubação (15, 10, 20, 45 e 70 dias), do experimento em microcosmos.....26

Figura 3 Análise de cluster (Correlação de Pearson, UPGMA) do perfil das bandas dos fragmentos do rRNA 16S para o Dominio Bacteria dos tempos T1 e T70 para o controle (C) e tratamento com fipronil (T).....27

Artigo 3

Figure 1 Experimental flow chart of the 36 microcosms (control and treatment with OTC at 2 mg L ⁻¹) and the sampling times (days).....	37
Figure 2 OTC concentrations from water microcosms in the sampling times.....	41
Figure 3 Mean values and standard deviation of NT (a) and DOC (b) concentrations (mg L ⁻¹) in water, from the control and treatment, in the incubation days of microcosm experiments.....	41
Figure 4 Mean values and standard deviation of bacterial density (cell mL ⁻¹) in water from the control and treatment, in the incubation days of microcosm experiments.....	42
Figure 5 Cluster analysis (Pearson correlation, UPGMA) for the profile bands of 16S rRNA fragments (Bacteria Domain) in times T1, T20 and T70, for the control (C) and treatment with OTC (T).....	42
Figure 6 Shannon Diversity Index during the experimental incubation period with oxytetracycline (treatment) and without (control).....	43

Lista de Tabelas

Artigo 1

Tabela 1 – Índice de diversidade de Shannon-Wiever (H') para os tratamentos T1(fipronil), T2 (fipronil+OTC), T3 (fipronil+IMZ) e T4 (fipronil+OTC+IMZ) nos tempos amostras de 1 e 70 dias.....10

Artigo 2

Tabela 1- Valores de média e desvio padrão das variáveis pH, CE ($\mu\text{S cm}^{-1}$) e OD(mg L^{-1}) dos experimentos controle e do tratamento (com fipronil) nos tempos amostrais (1, 5, 10, 20, 45 e 70 dias).....25

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
CE	Condutividade Elétrica
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COD	Carbono Orgânico Dissolvido
CPS	<i>Casein-Peptone-Starch</i> – Caseína-Peptona-Amido
DAD	Detecção por Arranjo de Diodos
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenil-indol
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
IMZ	Imazalil
k	Coefficiente kappa
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
rARN	ARN ribossomal
TAE	TRIS:Acetato:EDTA
$t_{1/2}$	Tempo de Meia-vida
TRIS	<i>Dimethylaminomethyl</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method using Arithmetic mean</i>

Apresentação da Tese

Esta pesquisa faz parte do projeto FAPESP (Processo no. 2013/02989-0), **Influência dos antibióticos oxitetraciclina e imazalil na diversidade e funções ecológicas microbianas em ambiente aquático**. A coordenadora do projeto é a Profa. Dra. Mirna Helena Regali Seleghim, pesquisadora do laboratório de Ecologia de Microrganismos Aquáticos (DEBE/ UFSCar). As professoras colaboradoras vinculadas ao projeto são:

- 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 (EESC/ USP)
- Profa. Dra. Maria Bernadete A. Varesche Silva, pesquisadora do Laboratório de Processos Biológicos (EESC/USP).

As colaboradoras discentes vinculadas ao projeto são:

- Helena Janke, doutoranda do Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPG-ERN/UFSCar)
- Zaryf Araji Dahroug Pacheco, doutoranda do Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPG-ERN/UFSCar)

A tese está apresentada em três artigos, nomeados como Artigo 1, Artigo 2 e Artigo 3. Cada artigo é constituído por: Resumo; Introdução; Material e Métodos; Resultados; Discussão; Conclusão; Referências Bibliográficas.

O Artigo 1, principal da tese, é intitulado “*Decaimento do fipronil em ambiente aquático na presença de compostos antimicrobianos isolados e em mistura*”. Foi acompanhado o decaimento do agrotóxico fipronil da presença dos antimicrobianos oxitetraciclina e imazalil, isolados e em mistura, a fim de identificar o efeito da presença destes na diversidade bacteriana. Foi avaliada também a possibilidade destes compostos comprometerem a função ecológica bacteriana de degradação do fipronil.

No Artigo 2 (“*Influência do agrotóxico fipronil na densidade e diversidade bacteriana aquática*”) o efeito da presença do fipronil na densidade e diversidade bacteriana foi investigado. Além disso, foi acompanhado o decaimento do composto por 70 dias de incubação.

O Artigo 3 está intitulado “Oxytetracycline effect on the structure of bacterioplankton in microcosm”. Neste artigo foram abordados aspectos relacionados à biodegradação da oxitetraciclina, além do seu efeito em variáveis abióticas, densidade e diversidade bacteriana aquática.

Além dos artigos, a tese possui dois Anexos nomeados como Anexo I e Anexo II. No Anexo I constam dados referentes ao estabelecimento de metodologia para extração e análise do antibiótico oxitetraciclina. No Anexo II é apresentada metodologia e resultados referentes à determinação da concentração dos compostos oxitetraciclina e imazalil que foram usados no trabalho.

Esses dados encontram-se em anexo por serem resultados comuns à outra tese de doutorado vinculada ao mesmo projeto de pesquisa. Estes resultados constituem artigos que serão publicados juntamente com outros dados que não pertencentes a esta tese.

Sumário

Artigo 1.....	1
Resumo.....	2
1 Introdução.....	2
2 Material e Métodos.....	4
2.1 Coleta de amostras de água.....	4
2.2 Design Experimental.....	4
2.3 Análise Cromatográfica do Fipronil em HLPC-DAD.....	5
2.4 Análises limnológicas abióticas.....	5
2.5 Diversidade bacteriana por Eletroforese em Gel de Gradiente de Desnaturação (DGGE).....	6
2.5.1 Extração de DNA.....	6
2.5.2 Amplificação do DNA – Reação em cadeia de Polimerase (PCR)..	7
2.5.3 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante – DGGE.....	7
2.6 Análises estatísticas.....	7
3 Resultados.....	8
3.1 Dados abióticos.....	8
3.2 Análise de Diversidade – DGGE.....	9
3.3 Decaimento do Fipronil.....	11
4 Discussão.....	12
5 Conclusões.....	14
6 Referências Bibliográficas.....	15
Artigo 2.....	18
Resumo.....	19
1 Introdução.....	19
2 Material e Métodos.....	21
2.1 Coleta de amostras de água.....	21
2.2 Design Experimental.....	21
2.3 Análise Cromatográfica do Fipronil em HLPC-DAD.....	21
2.4 Análises limnológicas abióticas.....	22
2.5 Densidade bacteriana.....	22

2.6 Diversidade Bacteriana por Eletroforese em Gel de Gradiente de Desnaturação (DGGE).....	23
2.6.1 Extração de DNA.....	23
2.6.2 Amplificação do DNA – Reação em cadeia de Polimerase (PCR).23	
2.6.3 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante – DGGE.....	24
2.7 Análises estatísticas.....	24
3 Resultados.....	25
3.1 Método QuEChERS / HPLC-DAD.....	25
3.2 Dados Abióticos.....	25
3.3 Densidade Bacteriana.....	26
3.4 Análise de Diversidade – DGGE.....	27
4 Discussão.....	27
5 Conclusões.....	29
6 Referências Bibliográficas.....	30
Artigo 3.....	34
Abstract.....	34
1 Introduction.....	34
2 Material and Methods.....	36
2.1 Sampling.....	36
2.2 Experimental setup.....	37
2.3 HPLC-SPE chromatographic analysis of Oxytetracycline (OTC).....	38
2.4 Abiotic analysis.....	38
2.5 Bacterial community densities.....	38
2.6 Bacterial diversity by DGGE.....	39
2.6.1 DNA extraction.....	39
2.6.2 Bacterial DNA amplification by polymerase chain reaction.....	39
2.6.3 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE).....	39
2.7 Statistical Analysis.....	40
3 Results.....	40
3.1 OTC chromatographic analysis.....	40
3.2 NT and COD analysis.....	41
3.3 Abiotic analysis x Bacterial density.....	41

3.4 Diversity analysis by DGGE.....	42
4 Discussion.....	43
4.1 OTC decay and its influence on biotic and abiotic variables.....	43
4.2 Bacterial density and nutrientes.....	44
4.3 Bacterial Diversity.....	44
5 Conclusions.....	45
6 Bibliographic References.....	46
Conclusão Geral e Considerações Finais.....	50
Anexo I Sensibilidade microbiana ao imazalil e a oxitetraciclina.....	52
Anexo II Método de Extração e Quantificação da Oxitetraciclina.....	56

Artigo 1

DECAIMENTO DO FIPRONIL EM AMBIENTE
AQUÁTICO NA PRESENÇA DE COMPOSTOS
ANTIMICROBIANOS ISOLADOS E EM MISTURA

Decaimento do fipronil em ambiente aquático na presença de compostos antimicrobianos isolados e em mistura

Resumo

O fipronil é um inseticida de amplo espectro que tem sido usado de forma generalizada e está sendo cada vez mais encontrado em ecossistemas aquáticos. A degradação microbiana é considerada o processo mais importante para remover este composto do ambiente. Porém a concomitante presença de compostos antimicrobianos no ambiente pode influenciar o processo de degradação. O objetivo desse estudo foi avaliar a influência do fungicida imazalil (IMZ) e do bactericida oxitetraciclina (OTC) no processo de degradação do fipronil em água. Foram montados experimentos divididos em quatro tratamentos distintos, contendo 18 microcosmos cada. Tratamento 1 (T1) com adição de 2 mg L⁻¹ de fipronil; Tratamento 2 (T2) com adição de 2mg L⁻¹ de fipronil e 2 mg L⁻¹ de oxitetraciclina; Tratamento 3 (T3) com adição de 2mg L⁻¹ de fipronil e 4 mg L⁻¹ de imazalil e Tratamento 4 (T4) com adição de 2mg L⁻¹ de fipronil, 2 mg L⁻¹ de oxitetraciclina e 4 mg L⁻¹ de imazalil. As amostras de água foram analisadas em tréplica nos tempos amostrais de 1, 5, 10, 20, 45 e 70 dias. A diversidade bacteriana foi estimada a partir dos padrões de banda do DGGE, por meio de índice de Shannon-Wiever. As alterações no COD (carbono orgânico dissolvido), NT (nitrogênio total) e pH foram acompanhadas. A concentração do fipronil foi avaliada pelo método QuEChERS / HPLC-DAD. Houve maior similaridade nos dados de COD e NT entre os tratamentos T3 e T4. O tempo de meia-vida do fipronil foi menor na ausência de compostos antimicrobianos (3,60d). Em contrapartida, no tratamento T4 em que houve a mistura dos compostos, o tempo de meia-vida foi o maior (5,1d). A diversidade bacteriana foi maior quando não exposta aos compostos antimicrobianos. Entretanto, não houve diferença significativa nas concentrações do fipronil nos diferentes tratamentos. Este resultado sugere que há redundância funcional entre os microrganismos presentes nos microcosmos.

Palavras-chave: redundância; oxitetraciclina; imazalil

1 Introdução

Fipronil {5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-4-[(trifluoromethyl)sulfinyl]-1*H*-pyrazole-3-carbonitrile} é um inseticida pertencente à classe dos fenilpirazóis. Foi primeiramente sintetizado por Rhône-Poulenc Ag Company (agora Bayer CropScience) em 1987 (Tingle et al. 2003). Controla um amplo espectro

de organismos, como baratas, mosquitos, gafanhotos, carrapatos e pulgas em estágio larval e fase adulta (Aajoud et al. 2003). É eficaz contra organismos resistentes a outros agentes tais como piretróides, organofosforados e carbamatos. Recentemente tem sido considerado como uma alternativa para diminuir o uso de agrotóxicos organofosforados altamente tóxicos (Li et al. 2007). A eficiência do fipronil fez com que este composto tivesse uma utilização generalizada e, como consequência, está sendo cada vez mais detectado em ecossistemas aquáticos (Nillos et al. 2009). Diante disto, se faz necessário um aumento de esforços de investigação sobre a degradação deste agrotóxico (Kim et al. 2011).

Os microrganismos podem ser úteis quando se trata da eliminação de poluentes agrotóxicos do ambiente (Kumar et al. 2012). A degradação microbiana, pela transformação parcial ou a completa mineralização de substâncias elementares, é um mecanismo importante no controlo do destino de agrotóxico e é geralmente considerado como desejável tanto do ponto de vista agrícola, como ambiental (Parkin et al. 1991). A degradação microbiana pode então ser considerado o processo mais importante para a irreversível remoção ambiental de agrotóxicos (Karpouzas & Singh, 2006). Vários autores estudaram a biodegradação do fipronil em solo (Zhu et al. 2003; Masutti & Mermut, 2007; Kumar et al. 2012; Mandal et al. 2013; Bonmatin et al., 2015), sedimento (Nillos et al. 2009; Peret et al. 2010) e água (Peret et al. 2010; Qu et al. 2014), com o objetivo de entender as principais condições que favorecem a biodegradação e os principais fatores que a influenciam.

Alguns fatores podem influenciar a degradação microbiana de agrotóxicos, como a presença de outros micropoluentes no ambiente, que podem afetar negativamente a microbiota e suas funções ecológicas. Entre estes compostos estão os antibióticos que são amplamente presentes no ambiente aquático e tem potencial de afetar adversamente aos organismos ali presentes. Um antibiótico é um agente quimioterapêutico que inibe ou suprime o crescimento de microrganismos, tais como bactérias, fungos ou protozoários (Kummerer, 2009).

Entre os compostos antimicrobianos amplamente usados encontra-se o fungicida imazalil (IMZ) e o bactericida oxitetraciclina (OTC). O IMZ ($C_{14}H_{14}Cl_2N_2O$) é um anti-fúngico usado extensivamente em plantações de frutas e tratamentos pós-colheita, pertencente ao grupo dos imadazol e derivados de triazol, de amplo espectro especialmente eficaz contra *Aspergillus* (Chin Su & Lin, 2002; Ortelli et al. 2005). Trata-se de um composto comumente encontrado em ambientes aquáticos (Castilho et

al. 2006; Gao et al. 2012; Campo et al. 2013; Masia et al. 2015). A OTC ($C_{22}H_{24}N_2O_9$) é um antibiótico de amplo espectro pertencente à classe das tetraciclinas (Kunkova et al. 2011) comumente usado por sua eficácia no tratamento de infecções causadas por bactérias gram-positivas e gram-negativas, micoplasmas e grandes vírus (Kołodziejaska et al. 2013). Também é amplamente encontrado em ambiente aquático (Hirsch et al. 1999; Jiang et al. 2014; Rico et al. 2014).

De forma geral, micropoluentes como agrotóxicos e antibióticos causam grande preocupação ecotoxicológica, principalmente quando se encontram em mistura (Schwarzenbach et al., 2006). Alguns trabalhos foram desenvolvidos anteriormente com o objetivo de identificar a influência de compostos antimicrobianos na degradação de agrotóxicos. Levanon (1993) verificou o efeito de bactericidas (entre eles a OTC) e do fungicida ciclohexamida. Streptomina e ciclohexamida foram os inibidores escolhidos por Ostrofsky et al. (2002). Kim et al. (2011) escolheu a classe dos antibióticos ionofóros. Todos eles objetivaram identificar a influência destes compostos na degradação da atrazina no solo. Já Naslund et al. (2008) avaliaram o efeito da ciprofloxacina na estrutura da comunidade bacteriana e degradação de pireno em sedimento marinho. Porém, nenhum trabalho avaliou o efeito dos antimicrobianos na degradação de agrotóxico em água.

Portanto, este estudo foi conduzido para investigar o efeito dos antimicrobianos comumente encontrados em ambientes aquáticos, IMZ e OTC na degradação do fipronil em microcosmos. O objetivo específico foi avaliar se a presença destes compostos afeta a diversidade bacteriana aquática e se, conseqüentemente, pode alterar a função ecológica bacteriana de degradação do fipronil.

2 Material e Métodos

2.1 Coleta de amostras de água

Os microcosmos experimentais foram montados com amostras de água coletadas na Represa do Beija-Flor localizada na Estação Ecológica do Jataí (EEJ). A EEJ possui uma área de 4.532,18 ha e está situada a nordeste do Estado de São Paulo, entre os paralelos 21°33' e 21°37' de latitude sul e 47°45' e 47°51' de longitude oeste, município de Luiz Antônio.

2.2 Procedimento Experimental

O fipronil comercial chamado de Regente 800WG® (80% fipronil e 20% celulose) foi a fonte de fipronil escolhida para realização deste estudo. Como fonte de oxitetraciclina e imazalil foram utilizados padrões adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) com pureza de 97% e 99,7%, respectivamente.

O experimento consistiu de 72 microcosmos, todos contendo o volume de 800 mL de água da Represa do Beija-Flor, divididos em quatro tratamentos: Tratamento 1 (T1): com adição de 2 mg L⁻¹ fipronil; Tratamento 2 (T2): com adição de 2 mg L⁻¹ fipronil e 2 mg L⁻¹ de oxitetraciclina; Tratamento 3 (T3): com adição de 2 mg L⁻¹ de fipronil e 4 mg L⁻¹ de imazalil; Tratamento 4 (T4): com adição de 2 mg L⁻¹ fipronil, 2 mg L⁻¹ de oxitetraciclina e 4 mg L⁻¹ de imazalil. A concentração do fipronil foi escolhida baseando-se na solubilidade do composto em água, que é baixa e de aproximadamente 2 mg L⁻¹ (Aajoud et al. 2003). Já a concentração de oxitetraciclina e imazalil foi selecionada para cada um dos compostos de acordo com resultados de teste de sensibilidade bacteriana e fúngica a estes compostos desenvolvido por Janke et al. (2014). Foram feitas seis análises temporais, em triplicata, nos tempos de 1, 5, 10, 20, 45 e 70 dias de incubação. Os microcosmos foram mantidos fechados, em condições de temperatura de 21°C e na ausência de luz, para evitar a fotodegradação dos compostos. O oxigênio dissolvido em todo o experimento ficou acima de 6 mg L⁻¹.

Em cada tempo amostral foram retirados três microcosmos de cada tratamento, aleatoriamente. Um volume de 300 mL de água foi reservado para a realização da análise de comunidade bacteriana por DGGE. Para mensuração da concentração de fipronil por cromatografia, foram reservados 10 mL de água. O restante foi utilizado para análises limnológicas abióticas.

2.3 Análise Cromatográfica do Fipronil por HLPC-DAD

As amostras de água dos experimentos foram analisadas utilizando HPLC, com equipamento SPD-M10A VP/DAD da Shimadzu.

Para extração do fipronil foram utilizados 10 mL de amostra na qual foram adicionados 5 mL de acetato de etila (EtOAc), 0,4 g de MgSO₄ e 0,1 g de NaCl. Centrifugou-se durante 5 min a 4000 rpm; transferiu-se 5 mL da fase EtOAc para um tubo de centrífuga com volume de 10 mL, que posteriormente foi secado em ar

comprimido e reconstituído para 500µL de acetonitrila. O método analítico desenvolvido para análise de fipronil foi definido em HPLC-DAD, monitorado em comprimento de onda de 230 nm, coluna Zorbax ODS C-18 (4,6 x 250 mm, 5 µm), com sistema de bombeamento isocrático na proporção 40:60 v/v, utilizando água ultrapura como fase aquosa e acetonitrila grau HPLC como fase orgânica. O tempo de meia vida do fipronil foi obtido pela equação 1.

$$t_{1/2} = \ln(2)/k \quad \text{Equação 1}$$

De acordo com este método, o limite de detecção e de quantificação são, respectivamente, 0,009 mg L⁻¹ e 0,027 mg L⁻¹ (Dahroug et al. dados não publicados).

2.4 Análises limnológicas abióticas

Depois da retirada de amostra para análise bacteriana, o pH foi analisado diretamente nos frascos por meio de potenciômetros digitais portáteis. Uma alíquota de 20 mL foi utilizada para a determinação das concentrações de Carbono Orgânico Dissolvido (COD) e Nitrogênio Total (NT) realizado por oxidação catalítica em alta temperatura (720°C), utilizando o analisador Shimadzu TOC-L.

2.5 Análise da comunidade bacteriana por Eletroforese em Gel de Gradiente de Desnaturação (DGGE)

Foram analisados dois dos seis tempos amostrais: 1 e 70 dias. De cada tempo, as réplicas foram integradas em uma única amostra, obtendo um volume final de 900 mL. Primeiramente, o volume de 890 mL da amostra de água foi filtrado em membrana de 0,22 µm de diâmetro de porosidade, com o intuito de acumular biomassa. A biomassa acumulada foi separada da membrana por raspagem e inserida em um tubo de centrifuga com volume de 15 mL, contendo 10 mL restante de amostra e novamente foi centrifugada. O sobrenadante foi descartado e a biomassa final obtida foi armazenada a -10°C por no máximo um mês, na ocasião extração de DNA.

2.5.1 Extração de DNA

A extração do DNA foi feita utilizando *glass beads* e mistura de fenol tamponado com tris: clorofórmio: tampão PBS (1:1:1: v/v) de acordo como método

desenvolvido por Griffiths et al. (2000) com modificações. Para verificar a integridade, qualidade do DNA extraído, foi realizada eletroforese em gel de agarose a 0,8% (m/v). O padrão das bandas do gel foi avaliado por meio do equipamento trans-iluminador UV (Stratagene – Eagle Eye™ III). O DNA também foi avaliado no espectrofotômetro NanoDrop 2.000 utilizando a relação A260/280 (concentração de DNA em relação as proteínas) com o intuito de garantir resultados dentro da faixa ideal (1,8 –2,00).

2.5.2 Amplificação do DNA – Reação em cadeia de Polimerase (PCR)

A PCR para o Domínio Bacteria foi feita utilizando os primers 968F-GC e 1401R (Nubel et al. 1996). A programação do termociclador para estas reações foi: desnaturação inicial a 95°C por 7 minutos; trinta e cinco ciclos envolvendo desnaturação a 94°C por 45 segundos; anelamento a 56°C por 45 segundos; extensão a 72°C por 1 minuto; extensão a 72°C por 10 minutos, resfriamento a 4°C.

2.5.3 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante – DGGE

O produto da PCR foi aplicado em gel de poliacrilamida 8% (m/v), em TAE 1X (Tris:Acetato:EDTA), com gradiente linear de desnaturante (uréia e formamida) variando entre 45% a 65%. A corrida foi realizada com 75 V a 60°C pelo tempo de 16h (Muyzer et al., 1993). Posteriormente o gel foi corado com brometo de etídeo e a leitura dos padrões de bandas do DGGE foi feita em câmara de trans-iluminador UV (*Stratagene Eagle Eye II*).

2.6 Análises estatísticas

Para a determinação da existência de diferença significativa entre os tratamentos, foi feito o teste de variância ANOVA *one-way*. O pressuposto de normalidade foi verificado pelo Teste de Shapiro-Wilk ($p>0.05$). Para todos os testes foi utilizado o nível de significância $p<0,05$. A análise de similaridade entre os dados limnológicos nos diferentes tratamentos foi desenvolvido por meio de análise de cluster ou agrupamento. Todos os testes citados anteriormente foram realizados utilizando o pacote estatístico Past (versão 2.17c) (Hammer et al. 2001).

A diversidade bacteriana foi determinada pelo índice Diversidade de Shannon-Wiever, calculado a partir do relatório da curva densiométrica das bandas padrões do DGGE. Os dendogramas com os resultados obtidos pelo DGGE foram construídos pelo

método UPMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*), com base no coeficiente de similaridade, usando o software Bionumerics, versão 3.5.

3 Resultados

3.1 Dados abióticos

Os valores de COD variaram de 1,17 a 3,94 mg L⁻¹ no T1, de 1,61 a 3,82 mg L⁻¹ no T2, no T3 de 1,91 a 4,9 mg L⁻¹ e no T4 de 2,82 a 4,68 mg L⁻¹ (Figura 1a). Em todos os tratamentos a concentração de COD foi maior no primeiro tempo amostral. A análise de similaridade (Figura 1b) identificou dois grupos mais semelhantes entre si: o primeiro, composto pelos tratamentos T1 e T2; e o segundo, constituído por T3 e T4 (ambos contendo IMZ). Os tratamentos T1 e T2 se diferenciaram estatisticamente do tratamento T4 quanto à concentração de COD (ANOVA *one-way* p<0,05).

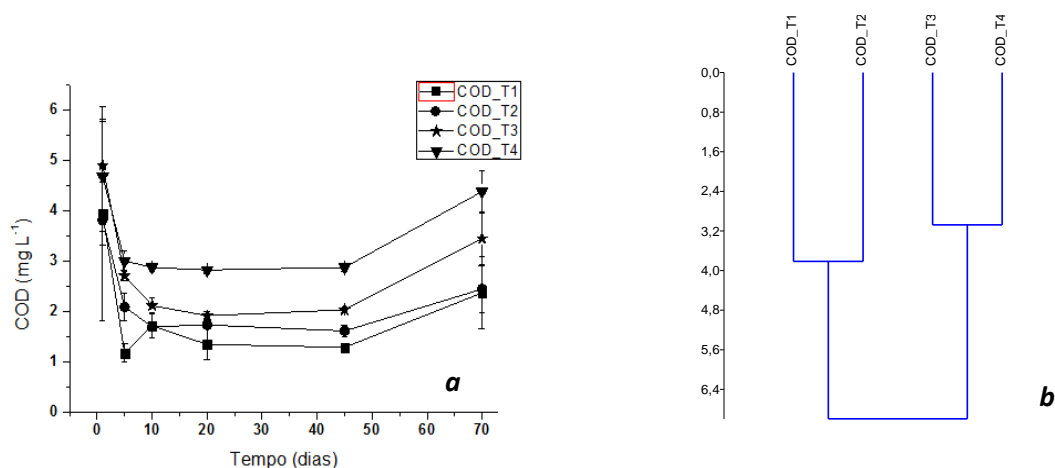


Figura 1 (a) Valores médios e desvios padrões do COD (mg L⁻¹) nos tratamentos T1(fipronil), T2 (fipronil+OTC), T3 (fipronil+IMZ) e T4 (fipronil+OTC+IMZ) durante os dias amostrais (1, 5, 10, 20, 45 e 70 dias) e (b) Análise de agrupamento do pH nos diferentes tratamentos.

Os valores de NT variaram de 0,10 a 0,17 mg L⁻¹ no T1, 0,15 a 0,23 mg L⁻¹ no T2, 0,16 a 0,37 mg L⁻¹ no T3 e 0,33 a 0,44 mg L⁻¹ no T4 (Figura 2a). Em todos os tratamentos, o primeiro e o segundo maiores valores de NT foram encontrados em 70 dias e 1 dia de incubação, respectivamente. A análise de similaridade identificou dois grupos mais semelhantes entre si (Figura 2b). O primeiro constituído pelos tratamentos T1 e T2 e o segundo por T3 e T4 (ambos contendo IMZ). Houve diferença significativa entre todos os tratamentos quanto à concentração de NT (ANOVA *one-way* p<0,05).

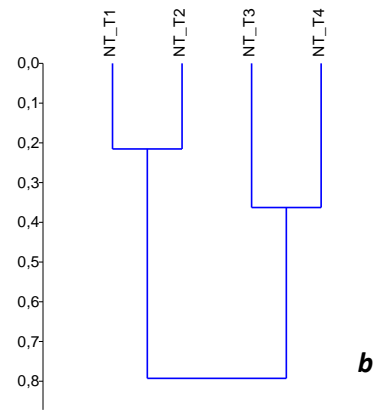
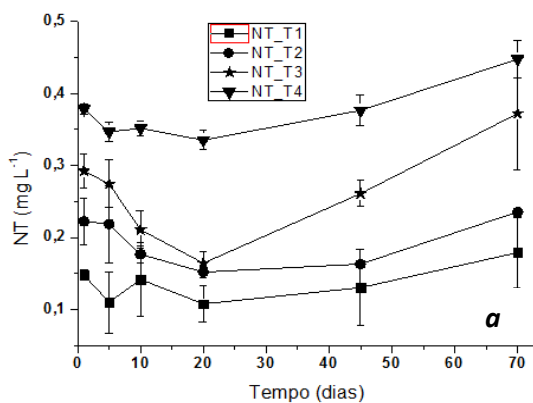


Figura 2 (a) Valores médios e desvios padrões do NT (mg L^{-1}) nos tratamentos T1(fipronil), T2 (fipronil+OTC), T3 (fipronil+IMZ) e T4 (fipronil+OTC+IMZ) durante os dias amostrais (1, 5, 10, 20, 45 e 70 dias) e (b) Análise de similaridade do pH nos diferentes tratamentos.

Os valores de pH variaram de 7,3 a 8,0 no T1, de 6,9 a 8,1 no T2, de 6,4 a 7,8 no T3 e de 6,9 a 7,8 no T4 (Figura 3a). Assim como para os dados de NT e COD, a análise de similaridade também identificou dois grupos mais semelhantes entre si (Figura 3b). O primeiro, constituído pelos tratamentos sem IMZ (T1 e T2); e o segundo, com os que continham IMZ (T3 e T4). Não houve diferença significativa entre os tratamentos quanto os valores de pH (ANOVA *one-way* $p > 0,05$).

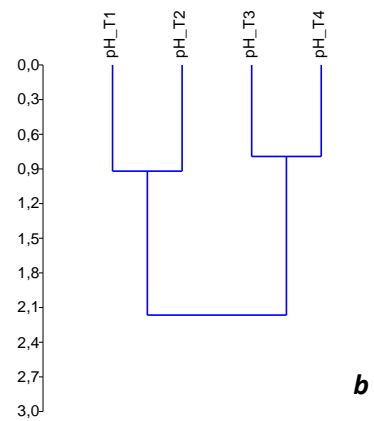
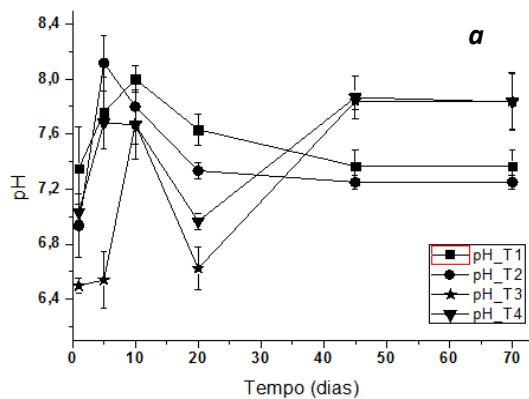


Figura 3 (a) Valores médios e desvios padrões do pH nos tratamentos T1(fipronil), T2 (fipronil+OTC), T3 (fipronil+IMZ) e T4 (fipronil+OTC+IMZ) durante os dias amostrais (1, 5, 10, 20, 45 e 70 dias) e (b) Análise de agrupamento do pH nos diferentes tratamentos.

3.2 Análise de Diversidade – DGGE

Mediante análise de agrupamento do perfil de bandas do DGGE, mudanças na comunidade bacteriana foram evidenciadas entre o primeiro dia e após 70 dias de

incubação (Figura 4). No primeiro tempo amostral (1d), houve maior similaridade (aproximadamente 97%) entre os tratamentos T3 e T4. O grupo contendo os tratamentos T2, T3 e T4 (todos contendo compostos antimicrobianos) foi similar em aproximadamente 93%. O tratamento T1 foi o que apresentou menor similaridade (85% aproximadamente) em relação aos demais.

Já com 70 dias de incubação, a comunidade bacteriana foi menos similar entre os tratamentos, porém o agrupamento dos tratamentos ocorreu de forma semelhante ao tempo de 1d. Os tratamentos T3 e T4 continuaram sendo os mais similares (aproximadamente 64%) e o grupo contendo os tratamentos T2, T3 e T4 foram similares em aproximadamente 50%. O tratamento T1, em que não houve adição de compostos antimicrobianos, apresentou 20% de similaridade em relação os demais tratamentos.

Desta forma, desde o início do experimento, houve uma tendência da comunidade bacteriana do tratamento T1 (contendo apenas fipronil) de se diferenciar dos demais tratamentos em que houve adição de compostos antimicrobianos isolados e em mistura.

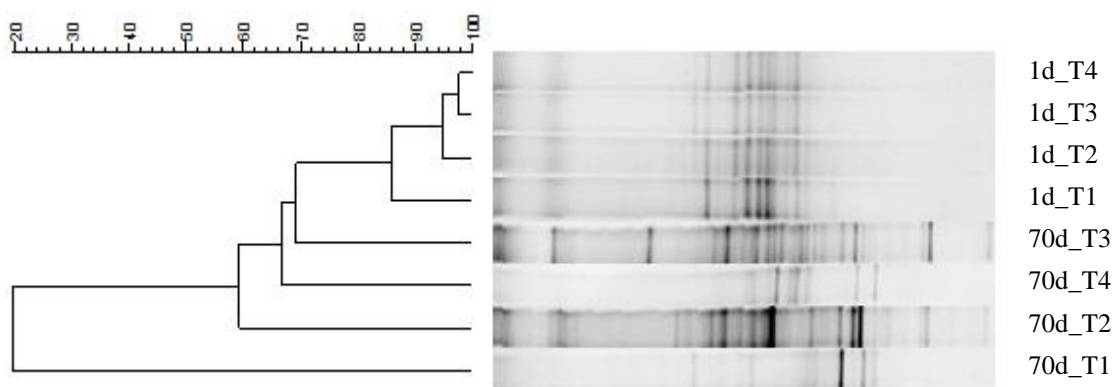


Figura 4 Análise de cluster (Correlação de Pearson, UPGMA) do perfil das bandas dos fragmentos do rRNA 16S para o Domínio Bacteria dos tempos de 1 e 70 dias nos tratamentos T1(fipronil), T2 (fipronil+OTC), T3 (fipronil+IMZ) e T4 (fipronil+OTC+IMZ).

Quanto aos valores de diversidade calculados por meio do índice de Shannon-Wiever, após 1 dia de incubação a diversidade entre os tratamentos foi bastante semelhante (Tabela 1). Porém, após 70 dias, houve aumento na diversidade apenas nos microcosmos que não continham o bactericida OTC. O Tratamento T2, em que houve adição de OTC, apresentou em 70 dias a mesma diversidade encontrada inicialmente. Já na comunidade bacteriana pertencente ao tratamento T4, que foi exposta a mistura de

OTC e IMZ, ocorreu diminuição da diversidade, sendo que o valor foi o menor encontrado em todos os tratamentos.

Tabela 1 – Índice de diversidade de Shannon-Wiever (H') para os tratamentos T1(fipronil), T2 (fipronil+OTC), T3 (fipronil+IMZ) e T4 (fipronil+OTC+IMZ) nos tempos amostras de 1 e 70 dias.

Tratamento / Dia	T1		T2		T3		T4	
	1d	70d	1d	70d	1d	70d	1d	70d
H'	2,6	3,75	2,68	2,68	2,52	3,72	2,67	2,47

3.3 Decaimento do Fipronil

A Figura 5 mostra a quantificação do fipronil durante o período experimental nos diferentes tratamentos empregados. Em todos os tratamentos, após 70 dias, o fipronil não pode ser quantificado pelo método utilizado, uma vez que a concentração encontrada foi menor que o limite de quantificação do método empregado ($0,027 \text{ mg L}^{-1}$). Porém, como o valor ficou acima do limite de detecção do método ($0,009 \text{ mg L}^{-1}$), pode-se considera-lo como ainda presente no microcosmo.

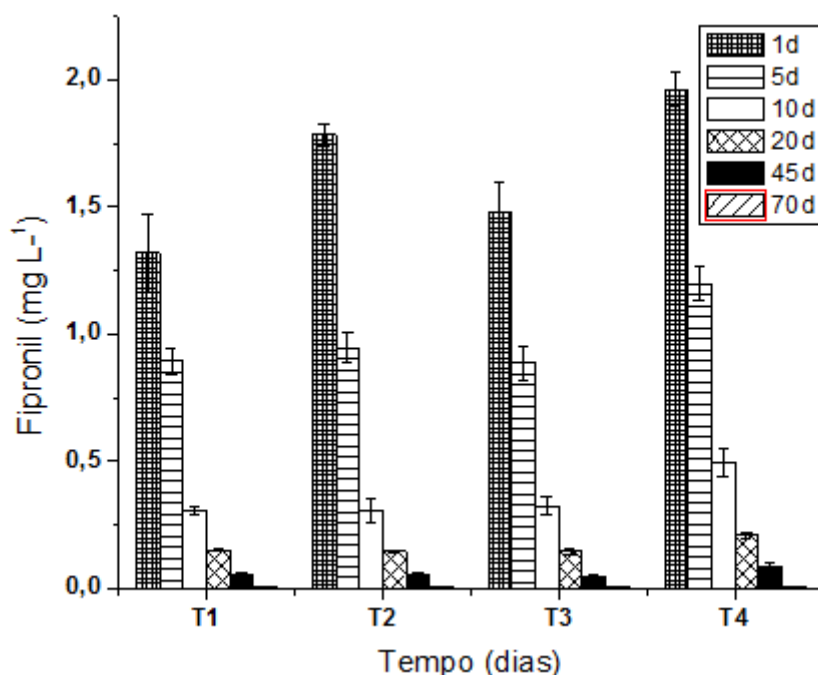


Figura 5 Concentração de Fipronil nos tratamentos T1(fipronil), T2 (fipronil+OTC), T3 (fipronil+IMZ) e T4 (fipronil+OTC+IMZ) durante os dias (d) amostrais (1, 5, 10, 20, 45 e 70 dias).

No T1, que não continha os compostos antimicrobianos, o decaimento do fipronil ocorreu mais rapidamente, sendo que neste tratamento a meia-vida para o composto foi de 3,6 d. No T2, em que foi adicionado OTC, o decaimento foi mais lento,

inclusive em relação ao T3, em que foi adicionado IMZ. Os tempos de meia-vida para T2 e T3 foram de 4,0 d e 4,7 d. Já no tratamento T4, em que houve mistura dos compostos antimicrobianos, a meia-vida do composto fipronil foi de 5,1 d, a maior entre os tratamentos. Apesar de no gráfico ser possível perceber uma sensível diferença no processo de degradação entre os tratamentos, esta não foi significativa (ANOVA *one-way* $p > 0,05$).

4 Discussão

Durante o período experimental, os valores de NT e COD foram nitidamente separados em dois grupos. O primeiro grupo composto pelos tratamentos T1 e T2 e segundo pelos tratamentos T3 e T4 (em comum a presença de IMZ). Baseado na massa molar do IMZ e na quantidade de moléculas de nitrogênio presentes nele, calcula-se que foi adicionado 0,15 mg de nitrogênio nos microcosmos pertencentes aos tratamentos em que houve adição do composto. Seguindo o mesmo raciocínio, os microcosmos contendo OTC tiveram uma adição de 0,096 mg de nitrogênio. Essa diferença fez com que os tratamentos contendo IMZ tivessem os maiores valores de nitrogênio e fossem semelhantes entre si quanto a esta variável. No T4 foram encontrados os maiores valores de nitrogênio, uma vez que houve adição tanto de OTC quanto de IMZ. Com COD foi semelhante. Pela presença do IMZ houve um acréscimo de 1,81 mg de carbono. Esse valor é superior ao acréscimo de carbono relacionado à presença de OTC (0,91 mg). Desta forma, os maiores valores de carbono foram encontrados nos tratamentos com IMZ e, principalmente, no T4 que continha também a OTC.

Detecção e quantificação da biodiversidade é um pré-requisito fundamental para a compreensão de como os ecossistemas e seus serviços são formados e como distúrbios antropogênicos afetam a saúde dos ecossistemas (Ager et al. 2010). O uso combinado das técnicas de biologia celular PCR-DGGE tem sido bastante aplicado para avaliar a diversidade microbiana em vários ambientes (Muyzer, 1999). Como esperado, os dados do presente trabalho mostraram que na presença da OTC, a diversidade bacteriana foi menor em relação ao controle. Kong et al. (2006) e Xin et al. (2014), estudando comunidade bacteriana do solo e digestão anaeróbia, respectivamente, identificaram também diminuição da diversidade bacteriana na presença de OTC.

A biodegradação de uma molécula normalmente envolve o efeito interativo de comunidades mistas de microrganismos e conta com a versatilidade metabólica de fungos e bactérias (Alexandre, 1999). Microrganismos como bactérias e fungos conseguem utilizar moléculas de agrotóxicos como fonte de carbono, nitrogênio e fósforo, sendo por este motivo considerados os principais degradadores destes compostos no ambiente aquático (Andrighetti, 2011). Em contrapartida, um antibiótico pode suprimir ou inibir o crescimento de microrganismos, tais como bactérias e fungos (Kummerer, 2009). A presença de compostos antimicrobianos resultou em maiores valores de meia-vida do fipronil. Isso pode ter sido consequência da supressão da comunidade bacteriana e fúngica quando expostas a estes compostos. Quando os compostos estavam em mistura, a meia-vida foi ainda maior, demonstrando a importância dos dois grupos microbianos no processo de degradação e na diminuição da persistência do fipronil.

Apesar das diferenças encontradas nos valores de meia-vida do fipronil e da diversidade bacteriana em consequência dos diferentes tratamentos, não houve diferença significativa na função ecológica microbiana de degradação do fipronil. A relação entre biodiversidade e funções ecossistêmicas tem sido muito debatida nos últimos anos (Comte et al. 2013). Ostrofsky et al. (2002) estudando a degradação de atrazina, não encontrou efeito diferencial marcante na mineralização deste composto como resultado do tratamento contendo estreptomicina, ciclohexamida e ambos. Levanon (1993) também não encontrou efeito da presença de fungicidas e bactericidas no processo de biodegradação de agrotóxico no solo, sendo que a taxa de mineralização na presença dos antimicrobianos foi quase idêntica à do controle. Souza et al., 2013, estudando solos brasileiros, notaram grandes diferenças na diversidade naqueles sob diferentes sistemas de manejo e regimes de cultura. Porém em análises funcionais, relataram que essas diferenças são bem menores sugerindo alta redundância funcional microbiana. Assim, embora a diversidade microbiana possa ser drasticamente reduzida na presença destes compostos, aparentemente o impacto sobre a diversidade funcional microbiana é menos acentuado (Souza et al., 2015). De forma contrária ao encontrado neste trabalho, Kim et al. (2011) identificaram diferença significativa na degradação da atrazina na presença de antibióticos da classe dos ionóforos em relação ao controle. Naslund et al. (2008) também identificaram uma correlação negativa entre a presença de antibióticos e a mineralização da atrazina.

Organismos que são funcionalmente redundantes sob um conjunto de condições podem não ser em condições diferentes. A redundância está ligada ao nível de sobreposição de capacidades funcionais entre as espécies dominantes, de modo que táxons diferentes oferecem funções semelhantes à comunidade (Burke et al, 2011). Em geral, sabe-se pouco sobre a distribuição de traços funcionais nas comunidades microbianas, apesar de anos de reconhecimento dessa necessidade (Alisson & Martini, 2008). Embora esteja bem documentado que populações microbianas são sensíveis a perturbações, os microrganismos também têm grande potencial de resiliência no longo prazo. Além disso, o distúrbio pode reduzir alguns táxons enquanto que outros se beneficiam, conseqüentemente podendo manter a funcionalidade (Kaschuk et al. 2010).

É válido ressaltar que os antibióticos também são biodegradados em ambientes aquáticos. Os produtos desta degradação podem incluir compostos que servem como fontes de carbono ou nitrogênio para os microrganismos (Ostrofsky et al., 2002). A presença destes nutrientes poderia compensar os efeitos inibitórios dos antimicrobianos no crescimento dos microrganismos. Isso poderia levar a um aumento da mineralização do fipronil, desse modo aliviando parcialmente o efeito negativo da inibição microbiana causada pelos antimicrobianos.

5 Conclusões

Muitos micropoluentes, tais como agrotóxicos e antibióticos, causam grande preocupação ecotoxicológica, principalmente quando se encontram em mistura. A presença do composto OTC isolado e, principalmente, em mistura com IMZ nas concentrações utilizadas, afeta negativamente a diversidade bacteriana aquática. Além disto, a presença destes compostos, também principalmente em mistura, aumenta o tempo de meia-vida do agrotóxico fipronil.

Apesar dos efeitos negativos do IMZ e OTC na diversidade bacteriana, não houve diferença significativa na diminuição da concentração do fipronil, sugerindo que exista redundância funcional entre as bactérias que constituíram a comunidade bacteriana dos microcosmos. Porém, este estudo considerou apenas um único evento de perturbação da comunidade bacteriana, ocorrido no início do experimento. Estudos de efeitos ecotoxicológicos crônicos devem ser realizados e são importantes para o

entendimento mais amplo do efeito destes compostos na comunidade bacteriana aquática.

6 Referências Bibliográficas

Aajoud A, Ravanel P, Tissut M (2003) Fipronil Metabolism and Dissipation in a Simplified Aquatic Ecosystem. *J. Agric. Food Chem.* 51:1347-1352.

Ager D, Evans S, Li H, Lilley AK, Van der Gast CJ (2010) Anthropogenic disturbance affects the structure of bacterial communities. *Environmental Microbiology* 12(3): 670–678.

Allison SD, Martiny JBH (2008) Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:11512–11519.

Andersson DI, Hughes D (2014) Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat. Rev. Microbiol.* 12:465–478.

Comte J, Fauteux L, Del Giorgio PA (2013) Links between metabolic plasticity and functional redundancy in freshwater bacterioplankton communities. *Frontiers in Microbiology* 4:1-11.

Bonmatin JM, Giorio C, Girolami V, Kreuzweiser DP, Kruoke C, Liess M, Long E, Marzaro M, Mitchell EAD, Noome DA, Simon-Delso N, Tapparo A (2015) Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ Sci Pollut Res* 22:35–67.

Brondi DHG, Macedo NA, Vicente GHL, Nogueira ARA (2011) Evaluation of the QuEChERS Method and Gas Chromatography–Mass Spectrometry for the Analysis Pesticide Residues in Water and Sediment. *Bull Environ Contam Toxicol* 86:18–22

Campo J, Masiá A, Blasco C, Picó Y (2013) Occurrence and removal efficiency of pesticides in sewage treatment plants of four Mediterranean River Basins. *Journal of Hazardous Materials* 263:146–157.

Castilho LE, Martínez E, Ruepert C, Savage S, Gilek M, Pinnock M, Solis E (2006) Water quality and macroinvertebrate community response following pesticide applications in a banana plantation, Limon, Costa Rica. *Science of the Total Environment* 367:418–432.

Gao Z, u Y, Zhao H, Ji F, He Q, Li S (2012) Concentration determination of new fungicide in river water by ultrasound-assisted emulsification micro-extraction and reversed-phase high performance liquid chromatography. *Anal. Methods* 4:2365-2368.

Gomes AI, Pires JCM, Figueiredo SA, Boaventura RAR (2014) Multiple linear and principal component regressions for modelling ecotoxicity bioassay response. *Environmental Technology* 35(8): 8:945–955.

Griffith JA, Martinko EA, Price KP (2000) Landscape structure analyses of Kansas in three scales. *Landscape Urban Plan.* 52:45–61.

Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia* 4:1-9. Available from: http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf.

Hirsch R, Ternes T, Haberer K, Kratz KL (1999) Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *The Science of the Total Environment* 225:109-118.

Janke H, Dahroug Z, Cunha-Santino, MB, Seeghim MR (2014) Sensitivity assessment of an aquatic environment microbial community to the antibiotic oxytetracycline. SETAC North America 35th Annual Meeting.

Jiang Y, Li M, Guo C, An D, Xu J, Zhang Y, Xi B (2014) Distribution and ecological risk of antibiotics in a typical effluent-receiving river (Wangyang River) in north China. *Chemosphere* 112:267–274.

Karpouzas DG, Singh BK (2006) Microbial degradation of organophosphorus xenobiotics: metabolic pathways and molecular basis. *Adv. Microbiol. Physiol.* 51: 119–225.

Kim SH, Fan M, Prasher SO, Patel RM, Hussain AS (2011) Fate and transport of atrazine in a sandy soil in the presence of antibiotics in poultry manures. *Agricultural Water Management* 98:653–660.

Kołodziejaska M, Maszkowska J, Białk-Bielinska A, Steudte S, Kumirska J, Stepnowski P, Stolte S (2013) Aquatic toxicity of four veterinary drugs commonly applied in fish farming and animal husbandry. *Chemosphere* 92:1253–1259.

Kong WD, Zhu YG, Fu BJ, Marschner P, He JZ (2006) The veterinary antibiotic oxytetracycline and Cu influence functional diversity of the soil microbial community. *Environmental Pollution* 143:129-137.

Kumar R, Singh B, Gupta VK (2012) Biodegradation of Fipronil by *Paracoccus sp.* in Different Types of Soil. *Bull Environ Contam Toxicol* 88:781–787.

Kümmerer K (2009) Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere* 75:417–434.

Levanon D (1993) Roles of fungi and bacteria in the mineralization of the pesticides atrazine, alachlor, malathion and carbofuran in soil. *Soil Biol. Biochem.* 25(8): 1097-1105.

Mandal K, Singh B, Jariyal M, Gupta VK (2013) Microbial degradation of fipronil by *Bacillus thuringiensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 93:87–92.

Masia A, Vásquez K, Campo J, Picó Y (2015) Assessment of two extraction methods to determine pesticides in soils, sediments and sludges. Application to the Túrria River Basin. *Journal of Chromatography A* 378:19-31.

Masutti CSM, Mermut AR (2007) Degradation of fipronil under laboratory conditions in a tropical soil from sirinhaém pernambuco, Brazil. *Journal of Environmental Science and Health Part B* 42:33–43.

Muyzer G, Wall EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analyses of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S RNAr. *Applied and Environmental Microbiology* 59(3): 695-700.

Näslund J, Hedman JE, Agestrand C (2008) Effects of the antibiotic ciprofloxacin on the bacterial community structure and degradation of pyrene in marine sediment. *Aquatic Toxicology* 90:223–227.

Nillos MG, Lin K, Gan K (2009) Enantioselectivity in fipronil aquatic toxicity and degradation. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(9):1825–1833.

Ostrofsky EB, Robinson JB, Traina SJ, Tuovinen OH (2002) Analysis of atrazine-degrading microbial communities in soils using most-probable-number enumeration, DNA hybridization, and inhibitors. *Soil Biology & Biochemistry* 34:1449–1459.

Peret AM, Oliveira LF, Bianchini-Jr I, Selegim MHR, Peret AC, Mozeto AA (2010) Dynamics of fipronil in Óleo Lagoon in Jataí Ecological Station, São Paulo-Brazil. *Chemosphere* 78:1225–1229.

Qu R, Ma, RX, Liu DH, Wang P, Huang LD, Qiu XX, Zhou ZQ (2014) Enantioselective toxicity and degradation of the chiral insecticide fipronil in scenedesmus obliquus suspension system. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 33(11):2516–2521.

Rico A, Oliveira R, McDonough S, Matser A, Khatikarn J, Satapornvanit K, Nogueira AJA, Soares AMVM, Domingues I, Brinck PJV (2014) Use, fate and ecological risks of antibiotics applied in tilapia cage farming in Thailand. *Environmental Pollution* 191:8-16.

Souza RC, Hungria M, Cantão ME, Vasconcelos ATR, Nogueira MA, Vicente VA (2015) Metagenomic analysis reveals microbial functional redundancies and specificities in a soil under different tillage and crop-management regimes. *Applied Soil Ecology* 86:106–112.

Tingle CC, Rother JA, Dewhurst CF, Lauer S, and King WJ (2003) Fipronil: environmental fate, ecotoxicology and human health concerns. *Rev Environ Contam Toxicol* 176:1– 66

Zhu G, Wu H, Guo J, Kimaro FME (2003) Microbial degradation of fipronil in clay loam soil. *Water, Air, and Soil Pollution* 153: 35–44.

Artigo 2

INFLUÊNCIA DO AGROTÓXICO FIPRONIL NA
DENSIDADE E DIVERSIDADE BACTERIANA
AQUÁTICA.

Influência do agrotóxico fipronil na densidade e diversidade bacteriana aquática.

Resumo

O fipronil é um inseticida que está sendo cada vez mais encontrado em ecossistemas aquáticos como resultado da sua utilização generalizada. Há uma grande preocupação quanto aos efeitos negativos do fipronil em vários organismos aquáticos não-alvo, dentre eles as bactérias. O objetivo deste estudo foi avaliar os aspectos ecológicos da presença do fipronil em ambientes aquáticos, entendendo como ele afeta a densidade e diversidade do bacterioplâncton. Foram montados 18 microcosmos contendo amostras de água de uma represa (controle) e 18 microcosmos idênticos com adição de fipronil na concentração de 2 mg L^{-1} , analisados em triplicata nos tempos amostrais de 1, 5, 10, 20, 45 e 70 dias. A diversidade bacteriana foi estimada a partir dos padrões de banda do Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE), por meio de índice do Shannon-Wiener. A densidade bacteriana foi estimada em microscopia de epifluorescência. As concentrações do fipronil foram estimadas pelo método QuEChERS / HPLC-DAD, sendo os limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD) de $0,027 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,009 \text{ mg mL}^{-1}$, respectivamente. A meia-vida do composto foi de aproximadamente 6,7 dias ($R^2=98\%$). Não houve diferença significativa entre o pH, condutividade e oxigênio dissolvido entre as amostras do controle e tratamento. A densidade bacteriana variou entre $1,57 \times 10^5$ e $3,48 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$ no controle e $2,14 \times 10^5$ e $4,5 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$ no tratamento e essa diferença foi significativa. A diversidade bacteriana no tratamento foi menor em relação ao controle no início do experimento (3,04 e 2,6, respectivamente), porém, ao final de 70 dias de incubação, as diversidades foram bastante similares. Isso pode significar que a comunidade bacteriana, uma vez perturbada pelo fipronil, foi resiliente, conseguindo se recuperar após o estresse causado pelo composto.

Palavras chave: agrotóxico; bacterioplâncton; QuEChERS

1 Introdução

O uso de agrotóxicos é de fundamental importância para sustentar práticas agrícolas modernas, incluindo as que ocorrem no Brasil, para manter a alta produtividade. Atualmente, diferentes substâncias químicas são usadas para controlar um conjunto de espécies indesejadas. Estas substâncias podem chegar às águas superficiais e causar efeitos adversos aos organismos não-alvo que constituem a biota aquática (Montagner et al. 2014)

O fipronil é um inseticida de amplo espectro pertencente à classe dos fenilpirazóis. Estes compostos foram recentemente introduzidos no mercado

consumidor e são considerados mais seletivos e menos prejudiciais para os ecossistemas se comparado com inseticidas organofosforados (Stark & Vargas, 2005). A aplicação do fipronil é eficaz para controle de pragas na cultura de cana-de-açúcar (Mann et al. 2009), arroz (Balança & De Visscher, 1997), verduras e frutas (Stevens et al. 1998), além de poder ser utilizado na área veterinária para o controle de parasitas externos (Hainzl & Casida, 1996).

O fipronil e seus produtos de transformação estão sendo cada vez mais encontrados em ecossistemas aquáticos como resultado da sua utilização generalizada (Nillos et al. 2009). No Brasil, vários estudos relatam a presença de resíduos de fipronil na água. Marchesan et al. (2010), estudando o rio Vacacaí, observaram a presença de fipronil na maioria das amostras. No rio Vacacaí-Mirimo, fipronil foi único agrotóxico dentre os estudados detectado nas amostras e apresentava elevada concentração. O fipronil foi o agrotóxico mais frequentemente detectado em águas superficiais de regiões orizícolas no sul do Brasil (Silva et al. 2009) e nas águas do Canal São Gonçalo e do Rio Piratini (Grützmacher et al. 2008).

O nosso conhecimento a respeito da forma com que as comunidades aquáticas reagem e se recuperaram a exposição a agrotóxicos, especialmente em relação aos seus resíduos, é deficiente (Hayasaka et al. 2012). Contaminação de água superficial em áreas em que o fipronil é ativamente usado tem um significativo potencial de impacto aos organismos aquáticos não-alvo (Kroger & Moore, 2011; Chagnon et al., 2015). Alguns estudos já evidenciaram efeitos negativos do fipronil em vários organismos aquáticos, como microalgas (Qu et al. 2014), microcrustáceo (Shan et al. 2003; Konwick et al. 2005), copépodos bentônicos (Cary et al. 2004; Bejarano et al. 2006; Chandler et al. 2012;) e peixes (Beggel et al. 2012; Hayasaka et al. 2012; Hayakasa, 2014).

Outros organismos não-alvo como as bactérias estão sujeitos a agrotóxicos em ambientes de água doce tropical, e são conhecidos por responder em prazos curtos a baixos níveis de poluentes (Daam et al. 2009; Knapp et al. 2005), principalmente devido à sua sensibilidade intrínseca e alta rotatividade da população (Paerl et al. 2003; Relyea, 2005). Peret et al. (2010) estudou em microcosmos o efeito do fipronil na comunidade bacteriana em sedimentos. Liu et al. (2005) avaliou o efeito da presença do fipronil na comunidade de protozoários planctônicos. Ambos identificaram alterações na estrutura da comunidade quando expostas ao composto. Porém, faltam estudos que abordem o efeito do fipronil no bacterioplâncton. Diante disto, o objetivo deste estudo é

avaliar experimentalmente o efeito do fipronil na densidade e diversidade bacteriana aquática.

2 Material e Métodos

2.1 Coleta de amostras de água

Os microcosmos experimentais foram montados com água coletada na Represa do Beija-Flor localizada na Estação Ecológica do Jataí (EEJ). A EEJ possui uma área de 4.532,18 ha e está situada a nordeste do Estado de São Paulo, entre os paralelos 21°33' e 21°37' de latitude sul e 47°45' e 47°51' de longitude oeste, município de Luiz Antônio. A Represa do Beija-flor foi construída pelo represamento do córrego do Beija-flor em 1965 e não existem estudos ecológicos anteriores ao represamento (Oliveira, 2011). Este ambiente foi escolhido por apresentar condições de baixo impacto ambiental.

2.2 Design Experimental

O experimento consistiu de 36 microcosmos divididos em dois tratamentos: 18 tratamentos com adição de 2 mg L⁻¹ de fipronil comercial Regente 800WG® (80% fipronil e 20% celulose) e 18 tratamentos sem adição de fipronil (controle). A concentração foi escolhida baseada na solubilidade do composto em água, que é baixa e de aproximadamente 2 mg L⁻¹ (Ajajoud et al. 2003). Os microcosmos foram mantidos fechados, em condições de temperatura de 21°C e na ausência de luz, para evitar a fotodegradação do fipronil. Foram feitas seis análises temporais, em triplicata, nos tempos de 1, 5, 10, 20, 45 e 70 dias de incubação.

Em cada tempo amostral foram escolhidos três microcosmos do controle e três do tratamento, aleatoriamente. De cada microcosmo selecionado, foram fixados 20 mL de água em formaldeído 2% para realização das análises de densidade bacteriana. O volume de 300 mL foi reservado para a realização da análise de diversidade bacteriana por DGGE. Dos microcosmos contendo fipronil, foram separados 10 mL de água para mensuração da concentração do composto por cromatografia. O restante foi utilizado para análises físicas e químicas.

2.3 Análise Cromatográfica do Fipronil em HPLC-DAD

As concentrações do fipronil nas amostras de água dos experimentos foram estimadas utilizando HPLC, com equipamento SPD-M10A VP/DAD da Shimadzu. O

padrão analítico foi adquirido de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), com 99% de pureza.

Para a extração do composto foram feitas modificações no método QuEChERS (Anastassiades et al. 2003; Lehotay et al. 2005) descrito em Brondi et al., 2011, que analisou fipronil em amostras de leite. O método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) possui muitas vantagens sobre os métodos tradicionais de preparo de amostra para determinação de resíduos de agrotóxicos tais como: altos percentuais de recuperação (> 85%); rápido preparo de amostras; utilização de um pequeno volume de solventes, além de não utilizar solventes clorados; não requerer a utilização de muitos materiais, equipamentos e espaço físico durante a execução do método (Prestes et al. 2009).

Para a extração do fipronil foram utilizados 10 mL de amostra na qual foram adicionados 5 mL de acetato de etila (EtOAc), 0,4 g de MgSO₄ e 0,1 g de NaCl. Centrifugou-se durante 5 min a 4000 rpm; transferiu-se 5 mL da fase EtOAc para um tubo de centrífuga com volume de 10 mL, que posteriormente foi secado em ar comprimido e reconstituído para 500µL de acetonitrila. O método analítico desenvolvido para análise do fipronil foi definido em HPLC-DAD, comprimento de onda em 230 nm, coluna Zorbax ODS C-18 (4,6 x 250 mm, 5 µm), com sistema de bombeamento isocrático na proporção 40:60 v/v, utilizando água ultrapura como fase aquosa e acetonitrila HPLC como fase orgânica. O tempo de meia-vida do fipronil foi obtido pela equação 1.

$$t_{1/2} = \ln(2)/k \quad \text{Equação 1}$$

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados de acordo com Ribani et al. (2004).

2.4 Análises limnológicas abióticas

Foram determinados diretamente nos microcosmos os valores de oxigênio dissolvido (OD) utilizando oxímetro digital portátil (550A-YSI); enquanto que a condutividade elétrica (CE) e valores de pH por meio de potenciômetros digitais portáteis.

2.5 Densidade bacteriana

A densidade das bactérias foi estimada a partir da filtração de sub-amostras de 1 mL de água proveniente do experimento. Foram utilizadas membranas de polycarbonato (Nucleopore[®]) pretas com 25 mm de diâmetro e abertura do poro de 0,2 µm, coradas com 1 mL do fluorocromo DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) na concentração de 0,1 g L⁻¹ durante 5 minutos no escuro. As lâminas foram montadas e então armazenadas em freezer (-20°C) no escuro e a contagem bacteriana realizada em prazo não superior a duas semanas. Foram contados 10 campos escolhidos aleatoriamente de cada lâmina e as densidades bacterianas foram calculadas de acordo com Bianchini (2004). Foi utilizado microscópio de epifluorescência Olympus[®] BH2, com luz de vapor de mercúrio (HBO 100W – OSRAM[®]).

2.6 Diversidade Bacteriana por Eletroforese em Gel de Gradiente de Desnaturação (DGGE)

2.6.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando *glass beads* e mistura de fenol tamponado com tris: clorofórmio: tampão PBS (1:1:1: v/v) de acordo como método desenvolvido por Griffiths et al. (2000) com modificações. Para verificar a integridade, qualidade e concentração do DNA extraído, foi realizada eletroforese em gel de agarose a 0,8% (m/v). O padrão das bandas do gel foi avaliado por meio do equipamento transiluminador UV (Stratagene – Eagle Eye TM III). O DNA também foi avaliado no espectrofotômetro NanoDrop 2.000 utilizando a relação A260/280 (concentração de DNA em relação as proteínas) com o intuito de garantir resultados dentro da faixa ideal (1,8 –2,00).

Foram escolhidos dois dos seis tempos amostrais: T1 e T70. De cada tempo, as réplicas foram integradas em uma única amostra, obtendo um volume final de 900 mL. Primeiramente, o volume de 890 mL da amostra foi filtrado em membrana de 0,22 µm de diâmetro de porosidade, com o intuito de acumular biomassa. A biomassa acumulada foi separada da membrana por raspagem e inserida em um tubo de centrífuga com volume de 15 mL, contendo os 10 mL restantes da amostra e novamente foi centrifugada. O sobrenadante foi descartado e a biomassa final obtida foi armazenada sob refrigeração a -10°C por no máximo um mês, na ocasião extração de DNA.

2.6.2 Amplificação do DNA – Reação em cadeia de Polimerase (PCR)

A PCR para do Domínio Bacteria foi realizada utilizando os *primers* 968F-GC e 1401R (Nubel et al. 1996). A programação do termociclador para estas reações foi: desnaturação inicial a 95°C por 7 minutos; trinta e cinco ciclos envolvendo desnaturação a 94°C por 45 segundos; anelamento a 56°C por 45 segundos; extensão a 72°C por 1 minuto; extensão a 72°C por 10 minutos, resfriamento a 4°C.

2.6.3 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante – DGGE

O produto da PCR foi aplicado em gel de poliacrilamida 8% (m/v), em TAE 1X (Tris:Acetato:EDTA), com gradiente linear de desnaturante (uréia e formamida) variando entre 45% a 65%. A corrida foi realizada com 75 V a 60°C pelo tempo de 16h (Muyzer et al. 1993). Posteriormente, o gel foi corado com brometo de etídeo e a leitura dos padrões de bandas do DGGE foi feita em câmara de trans-iluminador UV (*Stratagene Eagle Eye II*).

2.7 Análises estatísticas

Para a determinação da existência de diferença significativa entre o controle e o tratamento, foi realizado o teste de variância ANOVA *one-way* e Kruskal-Wallis, para dados normais e não normais, respectivamente. O pressuposto de normalidade foi verificado pelo teste de Shapiro-Wilk ($p > 0.05$).

Para determinar quais as principais variáveis determinantes da comunidade bacteriana e qual o poder delas em predizer a variável dependente, foi feita análise de regressão linear múltipla. A regressão foi realizada incluindo todos os fatores significativos e excluindo progressivamente aqueles não significativos ($p > 0,05$), buscando o modelo mais simples que apresentasse as variáveis mais representativas (método *Backward stepwise*). Os pressupostos destas análises foram verificados por meio da análise de resíduos.

A diversidade bacteriana foi determinada pelo índice Diversidade de Shannon-Wiever, calculado a partir do relatório da curva densiométrica das bandas padrões do DGGE. Os dendogramas com os resultados obtidos a partir do perfil de bandas do DGGE foram construídos pelo método UPMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*), utilizando coeficiente de similaridade, usando software Bionumerics, versão 3.5.

3 Resultados

3.1 Método QuEChERS / HPLC-DAD

No método de análise do fipronil por HPLC-DAD, o tempo de corrida foi de 15 minutos e a retenção do composto ocorreu em 11,7 minutos. O desvio padrão relativo médio do método foi de 1,92 % com linearidade satisfatória ($r^2 > 0,99$). O método de extração possibilitou uma recuperação média de 95% (coeficiente de variação de 5,2%). O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram $0,009 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,027 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. O tempo de meia-vida foi de 6,77 dias. O diminuição da concentração do fipronil em água nos diferentes tempos amostrais encontra-se na Figura 1.

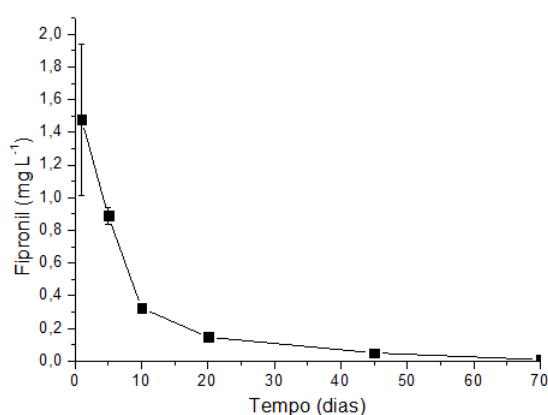


Figura 1 Concentração (mg L^{-1}) de fipronil em água dos microcosmos nos tempos amostrais (1, 5, 10, 20, 45 e 70 dias).

3.2 Dados Abióticos

Durante o período amostral, foram efetuadas análises abióticas de pH, CE e OD (Tabela 1).

Tabela 1- Valores de média e desvio padrão das variáveis pH, CE ($\mu\text{S cm}^{-1}$) e OD (mg L^{-1}) dos experimentos controle e do tratamento (com fipronil) nos tempos amostrais (1, 5, 10, 20, 45 e 70 dias).

Tempos Amostrais	pH		CE ($\mu\text{S cm}^{-1}$)		OD (mg L^{-1})	
	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento
T1	7,63±0,05	7,35±0,30	12,71±0,40	13,14±1,92	6,54±0,35	6,23±0,12
T5	7,90±0,20	7,75±0,26	13,47±1,18	15,22±1,69	6,41±0,41	6,29±0,37
T10	7,83±0,11	8,00±0,10	13,86±0,72	12,44±0,32	6,36±0,29	6,55±0,33
T20	7,50±0,10	7,63±0,11	13,33±0,86	13,23±0,12	5,86±0,11	6,86±0,04
T45	8,10±0,00	7,33±0,11	13,87±0,80	14,21±1,44	7,15±0,06	7,66±0,05
T70	8,03±0,11	7,83±0,20	13,91±0,62	13,33±0,24	7,45±0,48	6,48±0,23

O pH apresentou uma amplitude de variação muito semelhante entre o controle e tratamento, 0,6 e no tratamento 0,65, respectivamente. No tratamento, na maioria dos tempos amostrais, o pH ficou ligeiramente mais baixo em relação ao controle. A diferença na amplitude de variação na CE no tratamento foi sensivelmente superior ao ocorrido no experimento controle, $2,78 \mu\text{S cm}^{-1}$ e $1,2 \mu\text{S cm}^{-1}$. Em relação ao OD essa diferença também foi bastante sutil, $1,66 \text{ mg L}^{-1}$ no controle e $1,43 \text{ mg L}^{-1}$ no tratamento. Os dados abióticos do controle e do tratamento não apresentaram diferença significativa pela análise ANOVA *one-way* ($p > 0,05$).

3.3 Densidade Bacteriana

As densidades bacterianas nos tempos amostrais do controle e do tratamento estão apresentadas na Figura 2.

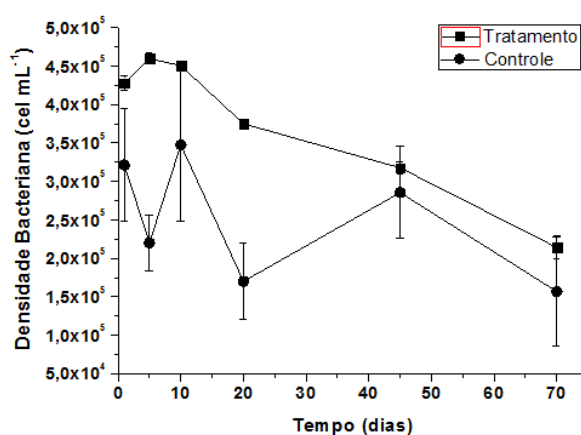


Figura 2 Valores médios e desvios padrões da densidade bacteriana aquática (cel mL^{-1}) controle e tratamento nos tempos de incubação (15, 10, 20, 45 e 70 dias), do experimento em microcosmos.

A densidade bacteriana no controle variou de $1,57 \times 10^5$ a $3,48 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$. Já no tratamento os valores foram maiores, variando de $2,14 \times 10^5$ a $4,5 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$. Com a presença de fipronil é possível perceber no início um aumento da densidade bacteriana seguido pela diminuição a partir de 5 dias. Quando o experimento chegou aos 40 dias de incubação, a densidade bacteriana do controle e tratamento se aproximaram. O resultado da ANOVA *one-way* indicou diferença significativa nas densidades bacterianas do controle e tratamento ($F=14,59$; $p=0,0005$).

Na análise de Regressão Linear Múltipla, testando quais parâmetros químicos tinham respostas significativas para densidade bacteriana no tratamento, apenas a concentração do fipronil apresentou p significativo, com um $R^2 = 0,51$ ($N= 18$; $F_{6,37}$; $P < 0,001$). CE, pH e OD somados resultaram num $R^2 = 0,15$, sugerindo que a concentração do fipronil é o principal fator analisado responsável pela variabilidade da

densidade bacteriana no tratamento. No controle, nenhum parâmetro analisado apresentou resposta significativa para densidade bacteriana.

3.4 Análise de Diversidade – DGGE

Pela análise de agrupamento (Figura 3) das amostras gerada a partir do coeficiente de similaridade, foi possível observar um agrupamento inicial entre as amostras no T1 pertencentes ao controle e o tratamento. Em um dia de incubação, a similaridade entre as amostras controle e tratamento ainda era alta (aproximadamente 90%). Com 70 dias de incubação, as comunidades bacterianas expostas ao fipronil e controle, apresentaram dissimilaridade próxima a 50%, sugerindo modificação na composição da comunidade bacteriana causada pelo composto.

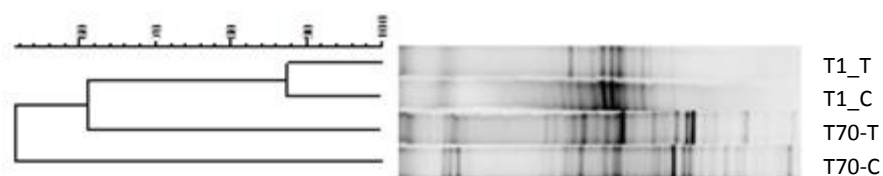


Figura 3 Análise de cluster (Correlação de Pearson, UPGMA) do perfil das bandas dos fragmentos do rRNA 16S para o Dominio Bacteria dos tempos T1 e T70 para o controle (C) e tratamento com fipronil (T).

O cálculo de diversidade por meio do índice de Shannon-Wiener mostrou que no primeiro dia após o início do experimento, a diversidade do tratamento foi menor em relação ao controle (2,6 e 3,04, respectivamente), sugerindo que inicialmente possa ter ocorrido supressão de algumas populações pelo fipronil. Porém, após 70 dias de incubação, a diversidade foi similar entre controle e tratamento (3,74 e 3,75, respectivamente), indicando que mesmo que tenha ocorrido mudança parcial na composição de espécies, esta não afetou a diversidade do bacterioplâncton, provavelmente pelo fato das comunidades terem conseguido se reestabelecer frente ao distúrbio causado pela ação do fipronil.

4 Discussão

Distintos ambientes possuem diferentes composições bacterianas, levando a diferenças no processo de biodegradação. Ngim & Crosby (2001) e Gunasekara et al. (2007) encontraram um tempo de meia-vida do fipronil em água de 5,2 dias, em temperatura de 24°C, na presença de luz. Nossos resultados mostraram um tempo de meia-vida em água de 6,7 dias. Considerando que hidrólise tem um pequeno impacto no

decaimento do fipronil (Peret et al. 2010) e que pelo fato dos microcosmos terem permanecido no escuro a fotodegradação não ocorreu, acredita-se que a biodegradação foi o fator determinante da meia-vida encontrada para o composto.

O limite de detecção (LD) é a mais baixa concentração da substância analisada que pode ser identificada por um método analítico particular, embora não possa ser quantificado (Ribani et al. 2004). O LQ e LD neste estudo foram superiores aos encontrados em outros trabalhos. Brondi et al. (2011) analisando fipronil em amostras de leite utilizando método QuEChERS encontraram valores de LD e LQ de $0,003 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,01 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. Cappeline et al. (2012) analisando fipronil em água por meio do método SPE/HPLC/DAD encontraram LD de $0,03 \text{ mg L}^{-1}$ e LQ de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$. O método QuEChERS é conhecido por resultar em valores de LQ e LD maiores em relação a outros métodos (Prestes et al. 2009). Porém, os benefícios relacionados à economia de custos, tempo e reagentes, faz com que este método seja amplamente usado e recomendado.

Dependendo da concentração, os agrotóxicos podem promover o crescimento bacteriano de espécies não sensíveis a eles e que podem utiliza-los como fonte de carbono. No presente trabalho a presença do fipronil afetou positivamente o crescimento bacteriano principalmente até o tempo de 5 dias. O fipronil também apresentou efeito positivo na densidade da comunidade bacteriana proveniente da Lagoa do Óleo, Brasil (Peret et al. 2011). Leboulanger et al. (2011) trabalhando com agrotóxicos encontraram um efeito positivo na densidade bacteriana nos primeiros cinco dias de experimento e concluíram que a presença de herbicida estimulou a abundância bacteriana. Vera et al. (2012), adicionando $3,5 \text{ mg L}^{-1}$ de glifosato a amostra de água de um lago, observaram aumento na abundância bacteriana aquática em microcosmos. Sura et al. (2012), com uma mistura de herbicidas, identificaram um número maior de bactérias com a presença destes.

Os maiores valores de densidade bacteriana na presença do fipronil e outros agrotóxicos podem ser caracterizados pelo aumento do crescimento das bactérias classificadas como *r*-estrategistas, que crescem rapidamente no período de 24-48h. Normalmente essas bactérias crescem mais em ambientes pouco estáveis, diferentemente das *k*-estrategistas (Bacmaga et al. 2014).

Detecção e quantificação da biodiversidade é um pré-requisito fundamental para a compreensão de como os ecossistemas funcionam e como distúrbios antropogênicos afetam a saúde do ecossistema (Ager et al., 2010). No primeiro dia após o início do

experimento, a diversidade do tratamento foi menor em relação ao controle. Porém, após 70 dias de incubação, a diversidade foi similar entre controle e tratamento. Peret et al. (2010) encontrou diferenças na diversidade nos tempos iniciais entre os microcosmos controle e expostos ao fipronil, porém, no último tempo amostrado (90 dias), as diversidades foram similares. Tadolnéké et al. (2009) evidenciou diminuição da diversidade bacteriana exposta ao diuron em tempos iniciais. Fang et al. (2015) estudando efeito da atrazina na diversidade bacteriana identificou, após um dia de incubação, diminuição da diversidade, porém, após 49 dias, a diversidade ficou bem semelhante a encontrada em microcosmos sem o agrotóxico. O aumento da diversidade no final do experimento pode indicar que a comunidade bacteriana foi resiliente a perturbação com fipronil, onde resiliência é a velocidade com que a comunidade retorna ao estado anterior (Begon et al. 2006).

É válido ressaltar que no experimento houve apenas um evento de contaminação, caracterizando um ensaio de toxicidade aguda. Após esse evento, a concentração de fipronil foi diminuindo pelo processo de degradação e concomitantemente houve diminuição do efeito tóxico aos organismos. Assim, a comunidade pôde se reestabelecer após a perturbação. Diante disto, testes crônicos devem ser desenvolvidos e realizados no futuro para verificar de forma mais completa o efeito tóxico do fipronil a comunidade bacteriana aquática.

5 Conclusões

Apesar dos LD e LQ não terem sido baixos em comparação com outros trabalhos, o método QuEChERS é relativamente eficiente para estimar a concentração de fipronil em água, visto seus benefícios.

A presença de fipronil altera a densidade bacteriana aquática, uma vez que pode estimular o crescimento bacteriano daquelas que podem utiliza-lo como fonte de nutrientes.

O fipronil leva a uma diminuição inicial na diversidade bacteriana aquática, porém o fator tempo é crucial para que a diversidade da comunidade bacteriana se reestabeleça, podendo ser considerada resiliente à perturbação causada. Desta forma, as pesquisas com esta abordagem devem considerar períodos amostrais longos para poderem acompanhar uma possível recuperação da comunidade perturbada.

6 Referências Bibliográficas

Aajoud A, Ravanel P, Tissut M (2003) Fipronil Metabolism and Dissipation in a Simplified Aquatic Ecosystem. *J. Agric. Food Chem.* 51:1347-1352.

Ager D, Evans S, Li H, Lilley AK, Van der Gast CJ (2010) Anthropogenic disturbance affects the structure of bacterial communities. *Environmental Microbiology* 12(3): 670–678.

Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck F (2003) Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J AOAC Int* 86:412–431

Bacmaga M, Kucharski J, Wyszkwka J, Borowik A, Tomkiel M (2014) Responses of microorganisms and enzymes to soil contamination with metazachlor. *Environmental Earth Sciences* 72(7):2251-2262.

Balança G, De Visscher MN (1997) Impacts on non-target insects of a new insecticide compound used against the desert locust (*Schistocerca gregaria* Forskll 1775). *Arch. Environ. Contam. Toxicol* 32(1):58-62.

Beggel S, Werner I, Connon RE, Geist JP (2012) Impacts of the phenylpyrazole insecticide fipronil on larval fish: time-series gene transcription responses in fathead minnow (*Pimephales promelas*) following short-term exposure. *Sci. Total Environ.* 426:160-165.

Begon M, Harper JL, Towhsend CR (2006) *Fundamentals in Ecology*. Porto Alegre: Artmed, 592p.

Bejanaro AC, Chandler GT, He L, Coull BC (2006) Individual to population level effects of South Louisiana crude oil water accommodated hydrocarbon fraction (WAF) on a marine meiobenthic copepod. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 332:49–59.

Brondi DHG, Macedo NA, Vicente GHL, Nogueira ARA (2011) Evaluation of the QuEChERS Method and Gas Chromatography–Mass Spectrometry for the Analysis Pesticide Residues in Water and Sediment. *Bull Environ Contam Toxicol* 86:18–22

Cappeline LTD, Cordeiro D, Brondi SHG, Prieto RT, Vieira EM (2012) Development of methodology for determination of pesticides residue in water by SPE/HPLC/DAD. *Environmental Technology* 33(20):2299–2304.

Cary t, Chandlers GT, Volz DC, Walse S, Ferry J (2004) Phenylpyrazole Insecticide Fipronil Induces Male Infertility in the Estuarine Meiobenthic Crustacean *Amphiascus tenuiremi*. *Environ. Sci. Technol.* 38:522-528.

Chandler GT, Ferguson PL, Klauber WW, Washburn KM (2012) A critical body residue approach for predicting persistent bioaccumulative toxicant effects on reproduction and population dynamics of meiobenthic copepods. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31(5): 1076–1082.

Chagnon M, Kreutzweiser D, Mitchell EAD, Morrissey CA, Noome DA, Sluijs JPV (2015) Risks of large-scale use of systemic insecticides to ecosystem functioning and services. *Environ Sci Pollut Res* 22:119–134.

Daam MA, Satapornvanit K, Brink PJVD, Nogueira AJA (2010) Direct and Indirect Effects of the Fungicide Carbendazim in Tropical Freshwater Microcosms. *Arch Environ Contam Toxicol* 58:315–324.

Fang H, Lian J, Wang H, Cai L, Yu Y (2015) Exploring bacterial community structure and function associated with atrazine biodegradation in repeatedly treated soils. *Journal of Hazardous Materials* 286:457–465.

Griffith JA, Martinko EA, Price KP (2000) Landscape structure analyses of Kansas in three scales. *Landscape Urban Plan.* 52:45–61.

Grützmacher DD, Grützmacher AD, Agostinetti D, Loeck AE, Roman R, Peixoto SC, Zanella R Monitoramento de agrotóxicos em dois mananciais hídricos no sul do Brasil (2008) *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 12(6) 632-637.

Gunasekara AS, Tuong T, Goh KS, Spurlock F, Tjeerdema RS (2007) Environmental fate and toxicology of fipronil. *J. Pestic. Sci.*, 32(3):189–199.

Hainzl D, Casida JE (1996) fipronil Insecticide: Novel Photochemical Desulfinylation with retention of Neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences: Agricultural Sciences.* 93:12764-12767.

Hayasaka D, Korenaga T, Suzuki K, Saito F, Sanchez-Bayo F, Goka K (2012) Cumulative ecological impacts of two successive annual treatments of imidacloprid and fipronil on aquatic communities of paddy mesocosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80:355–362.

Hayasaka D (2014) Study of the impacts of systemic insecticides and their environmental fate in aquatic communities of paddy mesocosms. *J. Pestic. Sci.* 39(3):172–173.

Knapp CW, Caquet T, Hanson ML, Lagadic L, Graham DW (2005) Response of water column microbial communities to sudden exposure to deltamethrin in aquatic mesocosms. *FEMS Microbiology Ecology* 54:157–165.

Konwick BJ, Fisk AT, Garrison AW, Avants JK, Black MC (2005) Acute enantioselective toxicity of fipronil and its desulfinyl photoproduct to *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(9):2350–2355.

Kroger R, Moore MT (2011) Chemical Residence Time and Hydrological Conditions Influence Treatment of Fipronil in Vegetated Aquatic Mesocosms. *J. Environ. Qual.* 40:559–565.

Leboulanger C, Bouvy M, Carre C, Cecchi P, Amalric A, Bouchez A, Pagano M, Sarazin G (2011) Comparison of the Effects of Two Herbicides and an Insecticide on Tropical Freshwater Plankton in Microcosms. *Arch Environ Contam Toxicol* 61:599–613.

Lehotay SJ, Mastovská K, Yun SJ (2005) Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. *J AOAC Int* 88:630–638.

Liu GG, Xu HJ, Wang LX (2005) Joint acute toxicity of fipronil and bata-cypermethrin to protozoa community. *Huanjing Kexue* 26(1):185-189.

Mann RS, Uppal SK, Sharma S, Mann KK (2009) Soil efficacy of fipronil to early stage pests of sugarcane, and its effect on development on *Chilo infuscatellus* Snellen (Crambidae: Lepidoptera). *Int. J. Pest Manag.* 55:307–315.

Marchesan E, Santorin GMS, Avilar LA, Machado SLO, Zanella R, Primel EG, Macedo VRM, Marchezan MG (2010) Residues of pesticides in the water of the Depression Central rivers in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Ciência Rural* 40(5):1053-1059

Montagner CC, Vidal C, Acayaba RD, Jardim WF, Jardim ICSF, Umbuzeiro GA (2014) Trace analysis of pesticides and an assessment of their occurrence in surface and drinking Waters from the State of São Paulo (Brazil). *Analytical Methods* 6:6668-6677.

Ngim HK, Crosby DG (2001) Abiotic processes influencing fipronil and desthiofipronil dissipation in california, usa, rice fields. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(5) 972–977.

Nillos MG, Lin K, Gan K (2009) Enantioselectivity in fipronil aquatic toxicity and degradation. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(9):1825–1833.

Oliveira EA (2011) Caracterização trófica da ictiofauna da Represa do Beija-Flor, Estação Ecológica do Jataí, Luiz Antônio, SP. PhD dissertation, Universidade Federal de São Carlos, Brasil.

Paerl HW, Dyble J, Moisander PH, Noble RT, Piehler MF, Pinckney JL, Steppe TF, Twoney L, Valdes LM (2003) Microbial indicators of aquatic ecosystem change: current applications to eutrophication studies. *FEMS Microbiology Ecology* 46:233-246.

Peret AM, Oliveira LF, Bianchini-Jr I, Selegim MHR, Peret AC, Mozeto AA (2010) Dynamics of fipronil in Óleo Lagoon in Jataí Ecological Station, São Paulo-Brazil. *Chemosphere* 78:1225–1229.

Prestes OD, Friggi CA, Adaime MB, Zanella R (2009) QuEChERS A modern sample preparation method for pesticide multiresidue determination in food by chromatographic methods coupled to mass spectrometry. *Química Nova* 32(6):1-15.

- Qu R, Ma, RX, Liu DH, Wang P, Huang LD, Qiu XX, Zhou ZQ (2014) Enantioselective toxicity and degradation of the chiral insecticide fipronil in scenedesmus obliquus suspension system. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 33(11):2516–2521.
- Relyea RA, Schoeppner NM, Hoverman JT (2005) Pesticides and amphibians: The importance of community context. *Ecological Applications* 15:1125–1134.
- Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF (2004) Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quím Nova* 27(5):771-80.
- Schwarzenbach RP, Escher BI, Fenner K, Hofstetter TB, Johnson CA, Gunten U, Wehli B (2006) The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science* 313(5790):1072-1077.
- Shan Z, Wang L, Cai D, Gong R, Zhu Z, Yu F. 2003. Impact of fipronil on crustacean aquatic organisms in a paddy field–fishpond ecosystem. *Bull Environ Contam Toxicol* 70:746–752.
- Silva DRO, Avila LA, Agostinetto D, Magro TD, Oliveira E, Zanella R, Noldin JÁ (2009) Pesticides monitoring in surface water of rice production areas in southern rural Brazil. *Ciência R* 39(9):2383-2389.
- Stark JD, Vargas RI (2005) Toxicity and hazard assessment of fipronil to *Daphnia pulex*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 62:11-16.
- Stevens, MM, Helliwell S, Warren GN (1998) Fipronil seed treatments for the control of chironomid larvae (Diptera: Chironomidae) in aerially-sown rice crops. *Field Crop Res*. 57: 195- 20.
- Sura S, Waiser M, Tumber V, Farenhorst A (2012) Effects of herbicide mixture on microbial communities in prairie wetland ecosystems: A whole wetland approach. *Science of the Total Environment* 435:34–43.
- Tadonlécé RD, LeBerre B, Perreau F, Humbert JF (2009) Responses of lake bacterioplankton activities and composition to the herbicide diuron. *Aquat Toxicol* 94:103–13.
- Vera MS, Di-Fiori E, Lagomarsino L, Sinistro R, Escaray R, Iummato MM, Juarez A, Molina MCR, Tell G, Pizarro H (2012) Direct and indirect effects of the glyphosate formulation Glifosato Atanor on freshwater microbial communities. *Ecotoxicology* 21:1805–1816.

Artigo 3

OXYTETRACYCLINE EFFECT ON THE STRUCTURE OF BACTERIOPLANKTON IN MICROCOSM

Oxytetracycline effect on the structure of bacterioplankton in microcosm

Abstract

Drug residues are often found in environmental matrices. One of the most worrying is the antimicrobials that have potential negative effects on bacterial community that plays a crucial role in the dynamics, stability and ecosystems processes. The objective of this study was to evaluate the ecological aspects of the oxytetracycline (OTC) action and effects on bacterial density and diversity in aquatic environments. It were constructed, in triplicates, 18 microcosms with OTC at 2 mg L^{-1} and 18 control microcosms that were analyzed at 1, 5, 10, 20, 45 and 70 days. The decay of OTC and changes in abiotic and biotic variables (diversity and bacterial density) were analyzed. The half-life of the compound was approximately 3.8 days ($R^2 = 98\%$). The total nitrogen (TN) and dissolved organic carbon (DOC) values were significantly different between the control and treatment. The bacterial density ranged from $1,57 \times 10^5$ to $3,48 \times 10^5$ cells mL^{-1} in control and $1,17 \times 10^5$ to $2,19 \times 10^5$ cells mL^{-1} in treatment samples and this difference was significant. The bacterial density was correlated negatively with DOC. In the treatment, the bacterial density was correlated negatively with OTC (oxytetracycline). Similar diversity values were observed between the control and treatment communities in T1 and T70, but in T20 we could observe higher diversity in the treatment. OTC can be mediated species coexistence controlling the bacteria with competitively higher growth potential, thereby increasing diversity.

Keywords: half-life; antimicrobials; bacterial diversity

1 Introduction

Antimicrobial agents are important drugs used in medicine. Besides the use for treatment of infectious diseases in humans, they are also used in veterinary medicine (Hirsch et al. 1999; Mamani et al. 2009). Until the 90s, antibiotics were exposed to the environment with little attention of researchers (Halling-Sorensen et al. 1998), but there has been growing interest in studying its presence and effects in aquatic environments Hirsch et al. (1999).

Tetracycline antibiotics are among the most widely used compounds as growth promoters and for drug therapy (Yang et al. 2009). Among the tetracyclines, oxytetracycline (OTC) is an antibiotic produced by the bacterium *Streptomyces rimosus* (Pickens & Tang 2009) that has broad spectrum with bacteriostatic action on Gram-positive and negative bacteria by protein synthesis inhibition (Rigos et al. 2006). It is one of the most common antibiotics used in aquaculture, especially to control fish

respiratory and intestinal infections (Liguoro et al. 2003; Shibata et al. 2014). Oxytetracycline is widely used in Brazil for bacterial infections treatment, prevention or used as growth promoters in livestock production. Despite the widespread use, there is no regulation for the use of these drugs (Junior et al. 2006).

After ingestion, the animals can not fully metabolize these compounds and a large proportion is excreted unchanged in the feces and urine. Therefore, the compound and its metabolites are released into the environment by leaching or runoff from manure or waste tanks, and affect aquatic and terrestrial organisms (Sarmah et al. 2006; & Reemtsma Jekel, 2006; Kolodziejska et al. 2013). Many of these compounds are still bioactive when they reach the environment (Zuccato et al. 2001).

The widespread use and the high frequency of reports about the presence of antibiotics in the environment is a great concern, largely because of the potential negative effects on microorganisms. Microorganisms play a crucial role in key ecosystem processes that sustain life on Earth, such nutrients regeneration, organic matter mineralization and pollutants degradation (Naslund et al. 2008). Although antibiotic concentrations in wastewater are relatively low, these levels can affect susceptible bacteria (Halling-Sørensen, 2001). The antibiotics action can cause changes in the natural communities composition by selective inhibition of sensitive bacteria (Nogales et al. 2010; Zhang et al. 2013). Tetracyclines, for example, can affect the bacterial biomass and possibly the ecosystem functions near the source of contamination (Shibata et al. 2014).

It is generally accepted that species richness reduction will occur as a result of a pollution event. In addition, the loss of species is accompanied by a change in community structure (Ager et al. 2010). Due to the magnitude and extent of worldwide pollution by antibiotics, laboratory studies to address this issue are of great importance. It is necessary to determine which microbial groups are affected by the presence of antibiotics in the water and how antibiotics would change the aquatic bacterial community structure. Thus, this study aims to assess the effects of oxytetracycline in the bacterial community structure in freshwater.

2 Material and Methods

2.1 Sampling

For the microcosm experiments, water samples were collected from the Beija-Flor Reservoir (Figure 1) that is located in the Jataí Ecological Station (JEE), northeast of São Paulo in the municipality of Luiz Antonio. The JEE has an area of 4532.18 ha and is situated between parallels 21 ° 33 ' and 21 ° 37' S and 47 ° 45 'and 47 ° 51' W. The reservoir was built in 1965 and there are no ecological studies prior to impoundment (Oliveira, 2011). This site was chosen because it is subjected to low environmental impacts and has no history of contamination by the antimicrobial compound selected for this study.

2.2 Experimental setup

The experiment consisted of 36 microcosms (Figure 1) divided into two treatments: with the addition of 2 mg L⁻¹ oxytetracycline (OTC) and without oxytetracycline (control). The OTC concentration was decided based on Janke et al. (2014) that concluded in this work that this is the sub-lethal concentration for the bacterial community in the Beija-Flor reservoir. Six temporal analyzes (at days 1, 5, 10, 20, 45 and 70 of incubation) were performed for each treatment, in triplicate. The microcosms were kept closed at 21 ° C in the absence of light to prevent OTC photodegradation.

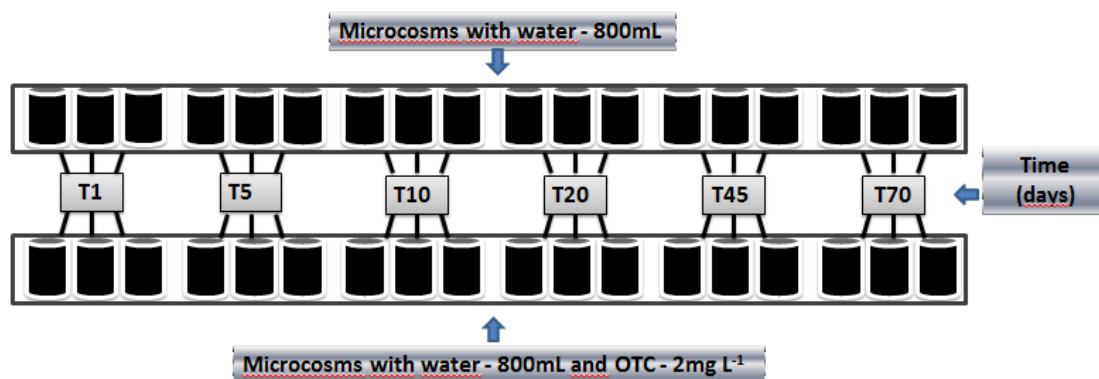


Figure 1 Experimental flow chart of the 36 microcosms (control and treatment with OTC at 2 mg L⁻¹) and the sampling times (days).

At the sampling times three microcosms were randomly removed from each treatment. For bacterial density analysis, 20 mL of water from each microcosm were fixed with formaline solution at 2% final concentration. For the analysis of bacterial community by DGGE, it was used 300 mL of each microcosm and 100 mL was used for

the measurement of OTC concentration by chromatography. The remainder was used for physical and chemical analysis.

2.3 HPLC-SPE chromatographic analysis of Oxytetracycline (OTC)

Water samples from the experiments were analyzed using a Shimadzu HPLC with SPD-M10A VP / DAD following methodology defined by Janke et al. (2014). The OTC extraction and concentration were performed with 100 mL sample aliquots. They were filtered through acetate cellulose membrane (0.45 μ m pore diameter), adjusted to 3.4 pH and added a Na₂EDTA solution at 0.02 M. The OTC extraction was made by solid phase extraction (SPE - Solid-phase extraction) using Strata-X cartridges (200 mg 3mL) conditioned with 5 mL methanol and 5 mL of ultrapure water (Milli-Q) adjusted to pH 4.0. After the sample, the cartridge was washed with 2 mL of a methanol 2% solution and dried at vacuum for 5 minutes. Elution was made with 10 mL of methanol, dried with air and the extract reconstituted with 1 mL of buffered EDTA (pH 7.0). The analytical method for the OTC analysis was defined in HPLC-DAD, monitored at 380 nm, using a Zorbax SB C-18 (4.6 x 250 mm, 5 μ m) column in the isocratic mode using a 60:40 v / v EDTA buffer mentioned above as aqueous phase and methanol HPLC grade as organic phase. The detection and quantification limit were 0.0134 mg L⁻¹ and 0.0406 mg L⁻¹, respectively.

2.4 Abiotic analysis

After sampling for bacterial analysis, we determined directly from the microcosm flasks: the dissolved oxygen values (OD) and water temperature with a portable digital oximeter (YSI-550A); and the electric conductivity and pH values with portable digital potentiometers. An 20 mL aliquot was used to obtain the dissolved organic carbon (DOC) and Total Nitrogen (TN) concentrations determined by catalytic oxidation at high temperature (720 ° C) using a Shimadzu TOC-L analyzer.

2.5 Bacterial community densities

The bacterial density was estimated in 1 mL sub-samples from the microcosms. Nucleopore® polycarbonate black membranes (25 mm and 0.2 μ m pore diameter) were used for samples filtration that were stained, in the dark, for 5 minutes with 1 mL of DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) solution at 0.1 g L⁻¹. The slides were mounted

and then stored at -20°C , in the dark, for a period not exceeding two weeks before bacterial counts were conducted. Using a epifluorescence microscope Olympus BH2 with mercury lamp (HBO 100W - OSRAM®), ten randomly selected fields were counted from each slide and the densities were calculated according to Bianchini (2004).

2.6 Bacterial diversity by DGGE

2.6.1 DNA extraction

PCR was made for three of the six sampling times: T1, T45, T70. For each time, the triplicates were integrated into a single sample, obtaining a final volume of 900 mL. From this volume, 890 mL was filtered through a 0.22 mm membrane (0.2 μm pore) in order to concentrate the biomass. The biomass was placed in a 15 mL centrifuge tube containing 10 mL of the remaining sample and centrifuged. The supernatant was then discarded and the final biomass obtained was kept under refrigeration until the DNA extraction.

DNA extraction was performed with Tris-buffered phenol: chloroform: PBS (1: 1: 1, v / v) using glass beads according to Griffiths et al. (2000) method with modifications. To verify the integrity, quality and concentration of the extracted DNA, electrophoresis was conducted in agarose gel at 0.8% (w / v). The pattern of gel bands was assessed by trans-illuminator UV equipment (Stratagene - Eagle Eye TM III). The DNA was also evaluated in the NanoDrop 2000 Spectrophotometer using the ratio $A_{260} / 280$ (DNA concentration relative to proteins) in order to guarantee results in the optimal range (1.8 -2.00).

2.6.2 Bacterial DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR)

The PCR for the Domain Bacteria was performed using the primers 968F-GC and 1401R (Nübel et al. 1996). The reactions were conducted with initial denaturation at 95°C for 7 minutes; thirty-five cycles of denaturation at 94°C for 45 seconds; annealing at 56°C for 45 seconds; extension at 72°C for 1 minute; final extension at 72°C for 10 minute, cooling at 4°C .

2.6.3 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

The PCR products were amplified in 8% (w / v) polyacrylamide gel using TAE 1X (Tris: Acetate: EDTA) with a linear denaturant gradient (urea and formamide) ranging from 45% to 65%. The run was performed with 75 V at 60 ° C for 16 h (Muyzer et al., 1993). Subsequently the gel was stained with ethidium bromide and the readings of the DGGE band patterns were made in an 254 nm UV trans-illuminator camera (Stratagene Eagle Eye III).

2.7 Statistical Analysis

The significance of the differences between control and the treatment were evaluated by ANOVA and Kruskal-Wallis analysis of variance, respectively, for normal and non-normal data.

To identify which of the abiotic variables were associated with bacterial density, normal data were correlated using Pearson's correlation coefficient (r) and for the other data it was used the Spearman rank correlations. For both tests we used the significance level of $p < 0.05$. The assumption of normality was verified by the Shapiro-Wilk test ($p > 0.05$). We also determined the Shannon diversity index and all tests were performed using the statistical package Past (version 2.17c) (Hammer et al. 2001.). The dendograms, using the DGGE data, were built with the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean method (UPMA), software Bionumerics, version 3.5.

3 Results

3.1 OTC chromatographic analysis

After only one day of incubation, there was a 22% decrease in the OTC concentration (Figure 3). The half-life calculated for the compound was approximately 3.8 days ($R^2 = 98\%$). In the last sampling time, T70, the OTC concentration was lower than the quantification limit of the method, so the compound was only detected in the sample.

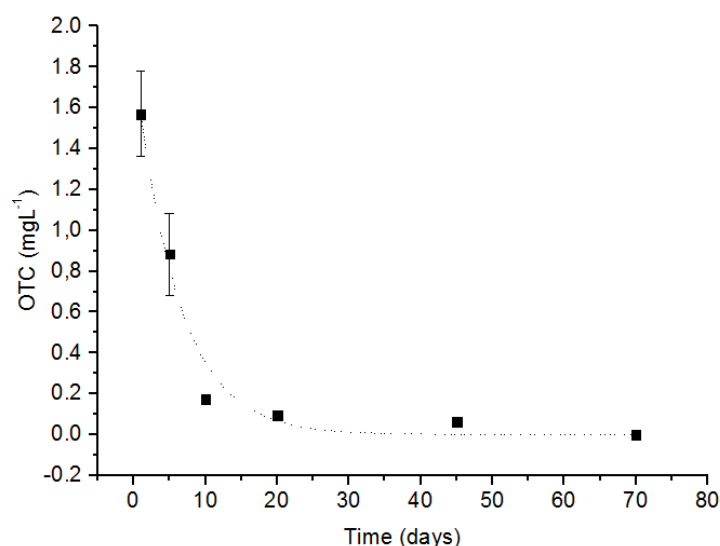


Figure 2 OTC concentrations from water microcosms in the sampling times.

3.2 NT and COD analysis

Using ANOVA analysis, the values of NT (Figure 3a) and COD (Figure 3b) were considered significantly different from control and treatment samples ($F = 62.58$, $p = 0.0001203$) and ($F = 5.754$, $p = 0.0221$), respectively.

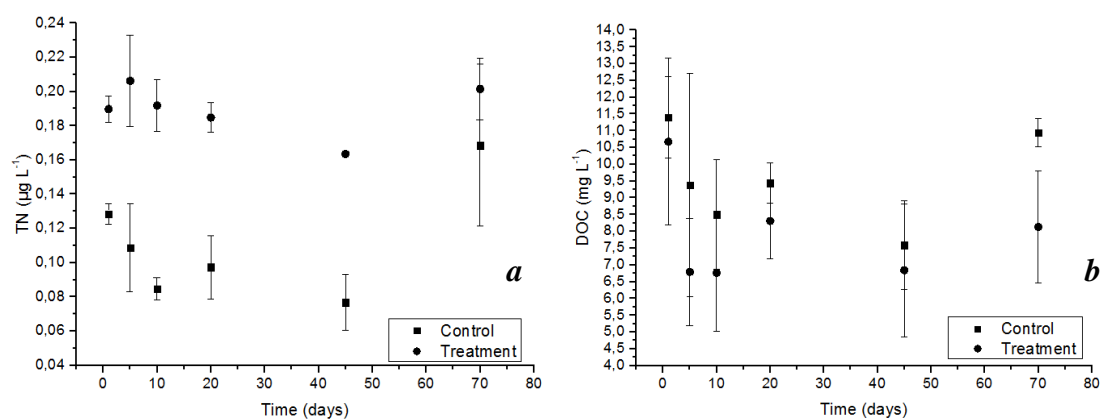


Figure 3 Mean values and standard deviation of NT (a) and DOC (b) concentrations (mg L^{-1}) in water, from the control and treatment, in the incubation days of microcosm experiments.

3.3 Abiotic analysis x Bacterial density

Bacterial density ranged from 1.57×10^5 cells mL^{-1} to 3.48×10^5 cells mL^{-1} in control and from 1.17×10^5 cells mL^{-1} to 2.19×10^5 cells mL^{-1} in treatment (Figure 4). This difference was significant ($F = 11.68$, $p = 0.002235$). In control samples, we could see that the density varied among the sampling times. On the other side, in the treatment

samples, there was a density decrease in the T20, followed by an increase in the subsequent incubation times.

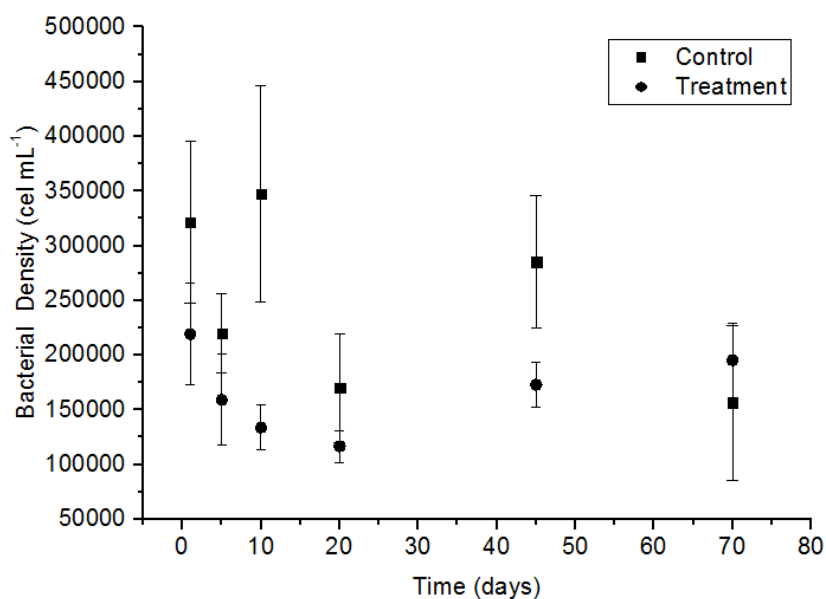


Figure 4 Mean values and standard deviation of bacterial density (cell mL⁻¹) in water from the control and treatment, in the incubation days of microcosm experiments.

The bacterial density in control microcosms correlated positively with OD ($r = 0.9466$, $p = 0.017007$) and negatively with COD ($r = 0.93965$, $p = -0.019222$), pH ($r = 0.87368$; $p = -0.040355$) and conductivity ($r = 0.8456$, $p = -0.04942$). In the treatment, the bacterial density only correlated with OTC concentrations ($r = 0.86727$, $p = 0.042421$).

3.4 Diversity analysis by DGGE

Cluster analysis suggested that the greatest similarity (> 90%) occurred among the control samples of T1 and treatment. In T70 the similarity (almost 70%) between samples was lower than at in the initial time. The higher dissimilarity occurred between the control and treatment samples: <10% in T20.

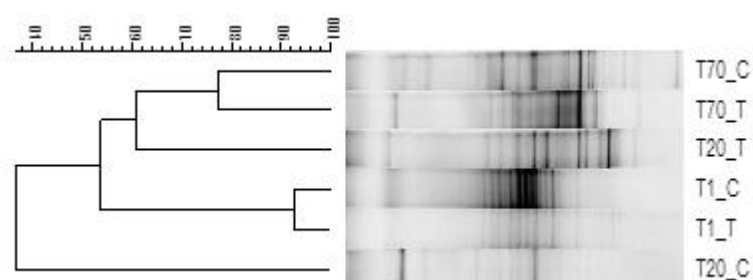


Figure 5 Cluster analysis (Pearson correlation, UPGMA) for the profile bands of 16S rRNA fragments (Bacteria Domain) in times T1, T20 and T70, for the control (C) and treatment with OTC (T).

According to the Shannon Index results (Figure 6), diversity was very similar in communities control and treatment T1 (2.94 to 2.73) and in T70 (3.75 to 3.74). But the index values for T20 were quite different between control and treatment (2.86 to 3.76), and the microcosms containing oxytetracycline showed higher diversity.

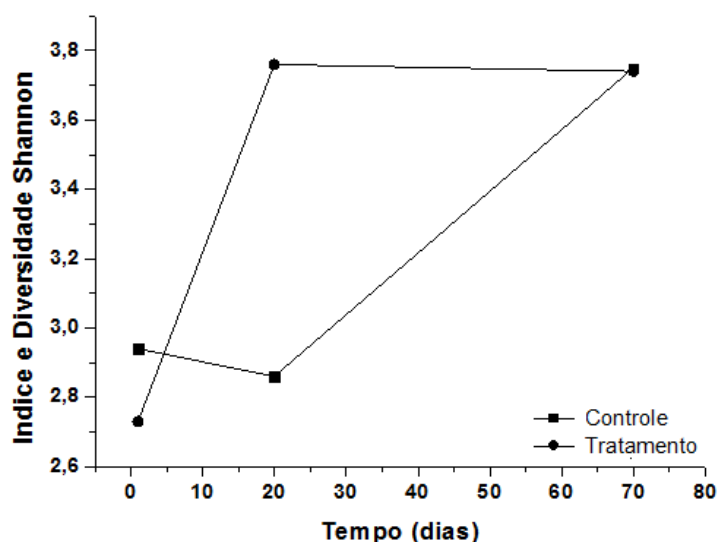


Figure 6 Shannon Diversity Index during the experimental incubation period with oxytetracycline (treatment) and without (control).

4 Discussion

4.1 OTC decay and its influence on biotic and abiotic variables

The half-life time for oxytetracycline in aqueous solutions is 26 h in pH 7 and 33h at pH 8.5 (USFDA ERA 1989). According to our data, the half-life was higher (3.88 days). As the microcosms were kept in the dark, the degradation of oxytetracycline was probably delayed, since its main degradation pathway is photolysis (Xuan et al. 2009). Scientific works in similar environmental matrices reported oxytetracycline half-lives times close those found in our study. Sanderson et al. (2005) found OTC half-lives ranging from 1 to 4 days, depending on its initial concentration. Chang et al. (2014) using the initial concentration of 5 mg L⁻¹ obtained a half-life time of 3.7 days.

There was a significant difference in bacterial densities between control and treatment and, in general, in control samples densities were higher. These differences

are probably due to the susceptibility of bacteria to OTC toxicity. OTC sensitive organisms have reduced growth thus decreasing its density (Shibata et al. 2014). We must also consider that OTC is a broad-spectrum antibiotic, thus acting in growth control of a large number of species. In the case of the significant differences found for DOC and TN between control and treatment, these must have occurred indirectly as a result of variation in the density of bacteria affected by the presence of OTC.

4.2 Bacterial density and nutrients

Bacteria are heterotrophic organisms associated with carbon metabolism in the pelagic environment and their densities in these environments are strongly affected by DOC (Gurung et al. 2002). A large part of the dissolved organic material can be consumed by these organisms (Bouvy et al. 1998). The bacterial density in control microcosms correlated negatively with COD. As the COD is generally considered a limiting factor of bacterioplankton growth (Kirchman, 1994), this is a possible explanation for what happened. The highest concentration for DOC in our work was approximately 11 mg L⁻¹. According to Jansson et al. (2001), DOC concentrations below 15 mg L⁻¹ may be nutritional limiting for bacteria in lakes. An inverse, but weak, relationship between bacterial abundance and DOC in aquatic environments was found by Deming & Carpenter (2008). Vezzulli & Fabiano (2006) found negative correlation between nutrients and bacterial density working with sediment in mesocosms. Pang et al. (2014) found the same negative correlation when analyzing COD and bacterial diversity. Farjalla et al. (2002) affirmed that COD is one of the main limiting factors of bacterial growth in tropical lakes. We emphasize that in our work the experimental system was closed, with no nutrient input, thus the COD concentrations varied with the bacterial consumption and their release by cellular death.

4.3 Bacterial Diversity

Although the antimicrobial compounds can inhibit the growth of bacterial strains competing for resources, in some cases, these compounds could also promote growth of other bacteria (D'Costa et al. 2006; Dantas et al. 2008) or modulate the expression of bacterial genes in sub-inhibitory concentrations (Goh et al. 2002). Thus, the sub-inhibitory concentration of OTC used in the present study may have controlled the

bacteria with the most competitive growth potential enabling the growth of others, mediating the coexistence of species and, ultimately, increasing diversity. This explains the greater diversity that was found in the treatment.

When the bacterial community does not change after a disturbance, it is considered resistant. If the composition of the bacterial community changes due to the disturbance, but recovers, it is considered resilient (Begon et al., 2006; Nogales et al., 2010). At the beginning of the experiment, at T1, the similarity of bacterial community between the control and treatment was higher than 90%. In the T20 this similarity was extremely low, less than 10%. After seventy days of incubation, the similarity increased to more than 70%, showing that the bacterial community managed to almost recover the effects of OTC. Due to their physiological and metabolic flexibility, rapid growth rates and adaptive potential, some species can recover after a disturbance, but others are more sensitive. Allison and (2008) using similarity analysis concluded that in the majority of pollution cases, the composition of the bacterial community is sensitive and not resistant to disturbances, showing low resilience.

Much of the research in microbiology focuses primarily on the role of antibiotics as bacterial growth inhibitors in the environment or on the problem of bacterial resistance. However, despite these approaches are extremely important, it is essential that more studies focuses on diversity issues, ensuring a better understanding of the real effects of OTC and others compounds on aquatic bacterial community.

5 Conclusions

The OTC, in sub-inhibitory concentration, can promote increased diversity by the control of the bacteria with the most competitive growth potential enabling the growth of others, mediating the coexistence of species.

In closed systems, the bacterial density may be limited by DOC, resulting in a negative correlation.

Seventy days after the disruption caused by OTC, bacterial community is not fully recovered of this impact, showing that, under the conditions used in this study, this community is not resilient.

6 Bibliographic References

- Ager D, Evans S, Li H, Lilley AK, Van der Gast CJ (2010) Anthropogenic disturbance affects the structure of bacterial communities. *Environmental Microbiology* 12(3): 670–678.
- Allison SD, Martiny JBH (2008) Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:11512–11519.
- Begon M, Townsend CR, Harper JL (2006) *Ecology: from individuals to ecosystems*. Blackwell Publishing, Oxford.
- Bouvy M, Barros-Franca LM, Carmouze JP (1998) Compartimento microbiano no meio pelágico de sete açudes do estado de Pernambuco. *Acta Limnol. Bras.* 10(1):93-101
- Chang BV, Hsu FY, Liao HU (2014) Biodegradation of three tetracyclines in swine wastewater. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 49: 449–455
- D’Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD (2006) Sampling the Antibiotic Resistome. *Science* 311(5759):374-377
- Dantas G, Sommer MOA, Oluwasegun RD, Church GM (2008) Bacteria Subsisting on Antibiotics. *Science* 320(5872):100-103
- Deming JW, Carpenter SD (2008) Factors influencing benthic bacterial abundance, biomass, and activity on the northern continental margin and deep basin of the Gulf of Mexico. *Deep-Sea Research II* 55:2597–2606
- Goh EL, Young JK, Kuwako K, Tessier-Lavigne M, He Z, Griffin JW, Ming GL (2008) Beta1-integrin mediates myelin-associated glycoprotein signaling in neuronal growth cones. *Mol Brain* 1:10
- Griffith JA, Martinko EA, Price KP (2000) Landscape structure analyses of Kansas in three scales. *Landscape Urban Plan.* 52:45–61
- Gurung TB, Urabe J, Nozaki K, Yoshimizu C, Nakanishi M (2002) Bacterioplankton production in a water column of Lake Biwa. *Lakes and Reservoirs: Res. Manag.* 7(4) 317-323
- Halling-Sørensen B (2001) Inhibition of Aerobic Growth and Nitrification of Bacteria in Sewage Sludge by Antibacterial Agents. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40:451 - 460
- Halling-Sorensen B, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten Liitzhofl HC, Jorgensen SE (1998) Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment- A Review. *Chemosphere*, 36(2): 357-393

Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia* 4:1-9. Available from: http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf

Hirsch R, Turner T, Haberer K, Kratz KL (1999) Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *The Science of the Total Environment* 225:109-118

Janke H, Dahroug Z, Cunha-Santino, MB, Seeghim MR (2014) Sensitivity assessment of an aquatic environment microbial community to the antibiotic oxytetracycline. SETAC North America 35th Annual Meeting

Jansson M, Bergstrom AK, Drakare S, Blomqvist P (2001) Nutrient limitation of bacterioplankton and phytoplankton in humic lakes in northern Sweden. *Freshwater Biology* 46(5):653–666

Junior DJP, Figueiredo HCP, Carneiro DO, Leal CAG (2006) Minimal inhibitory concentration to oxitetracycline in *Aeromonas hydrophila* strains isolated from different sources. *Ciênc. Agrotec* 30(6):1190-1195

Kirchman DL (1994) The uptake of inorganic nutrients by heterotrophic bacteria. *Microb. Ecol.* 28: 255-271

Kołodziejaska M, Maszkowska J, Białk-Bielinska A, Steudte S, Kumirska J, Stepnowski P, Stolte S (2013) Aquatic toxicity of four veterinary drugs commonly applied in fish farming and animal husbandry. *Chemosphere* 92:1253–1259

Liguoro M, Cibin V, Capolongo F, Halling-Sorensen B, Montesissa C (2003) Use of oxytetracycline and tylosin in intensive calf farming: evaluation of transfer to manure and soil. *Chemosphere* 52 (2003) 203–212

Mamani MCV, Reyes FGR, Rath S (2009) Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD. *Food Chemistry* 117:545–552

Muyzer G, Wall EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analyses of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S RNAr. *Applied and Environmental Microbiology* 59(3): 695-700

Näslund J, Hedman JE, Agestrand C (2008) Effects of the antibiotic ciprofloxacin on the bacterial community structure and degradation of pyrene in marine sediment. *Aquatic Toxicology* 90:223–227

Nogales B, Lanfranconi MP, Piña-Villalonga JM, Bosch R (2010) Anthropogenic perturbations in marine microbial communities. *FEMS Microbiol Rev* 35:275–298

Nubel U, Engelen B, Felske A, Snaidr J, Wieshuber A, Amann RI, Ludwig W, Backhaus H (1996) Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology* 178(19): 5636–5643

Oliveira EA (2011) Caracterização trófica da ictiofauna da Represa do Beija-Flor, Estação Ecológica do Jataí, Luiz Antônio, SP. PhD dissertation, Universidade Federal de São Carlos, Brasil.

Pang X, Yuan XZ, Cao ZD, Fu SJ (2014) The effects of fasting on swimming performance in juvenile qingbo (*Spinibarbus sinensis*) at two temperatures. *Journal of Thermal Biology* 42: 25–32

Pickens LB, Tang Y (2009) Decoding and engineering tetracycline biosynthesis. *Metab. Eng.* 11:69–75

Reemtsma T, Jekel M (2006) *Organic Pollutants in the Water Cycle*. Wiley-VCH, ISBN 3- 527-31297-8, Weinheim, Germany

Rigos G, Nengas I, Alexis M (2006) Oxytetracycline (OTC) uptake following bath treatment in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *AQUACULTURE* 261(4): 1151–1155

Sanderson H, Ingerslev F, Brain RA, Halling-Sørensen B, Bestari JK, Wilson CJ, Johnson DJ, Solomon KR (2005) Dissipation of oxytetracycline, chlortetracycline, tetracycline and doxycycline using HPLC–UV and LC/MS/MS under aquatic semi-field microcosm conditions. *Chemosphere* 60:619–629

Sarmah AK, Meyer MT, Boxall ABA (2006) A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* 65:725–759

Shibata K, Amemiya T, Itoh K (2014) Effects of oxytetracycline on populations and community metabolism of an aquatic microcosm. *Ecol Res* 29:401–410

Vezulli L, Fabiano M (2006) Sediment biochemical and microbial variables for the evaluation of trophic status along the Italian and Albanian continental shelves. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 86: 27–37

Xuan R, Arisi L, Wang Q, Yates SR, Biswas KC (2009) Hydrolysis and photolysis of oxytetracycline in aqueous solution. *Journal of Environmental Science and Health Part B* 45:73–81

Yang Q, Zhang J, Zhu K, Hao Z (2009) Influence of oxytetracycline on the structure and activity of microbial community in wheat rhizosphere soil. *Journal of Environmental Sciences* 21:954–959

Zhang Y, Xie J, Liu M, Tian Z, He Z, Nostrand JD, Ren L, Zhou J, Yang M (2013) Microbial community functional structure in response to antibiotics in pharmaceutical wastewater treatment systems. *Water Research* 47:6298 -6308

Zuccato E, Bagnati R, Fioretti F, Natangelo M, Calamari D, Fanelli R (2001) Environmental loads and detection of pharmaceuticals in Italy. In: Kämmerer K (ed) *Pharmaceuticals in the environment*. Springer-Verlag, Berlin

Conclusão Geral e Considerações Finais

Este estudo objetivou perceber o efeito na comunidade bacteriana quando exposta a compostos tóxicos como o imazalil, a oxitetraciclina e o fipronil. Nos artigos 1, 2 e 3, vários dados foram apresentados dando muitas sugestões de como estes compostos podem alterar a estrutura da comunidade bacteriana ao longo do tempo.

O artigo 1 tratou-se da possível perda de função ecológica bacteriana quando esta foi exposta ao evento de contaminação por imazalil e oxitetraciclina. Muitos autores tem associado diversidade com ecologia funcional. Outros, principalmente quando se trata de microrganismos, acreditam que essa relação não seja tão estreita, pelo fato de que possivelmente haja redundância funcional entre as comunidades microbianas. Neste artigo houve diferença na diversidade bacteriana quando exposta aos antimicrobianos e fipronil, porém a perda da função ecológica de degradação do fipronil não pareceu significativa. Isso pode ser um indício de que há redundância funcional nas populações pertencentes à comunidade bacteriana estudada.

No artigo 2, quando o fipronil foi avaliado isoladamente quanto ao seu efeito tóxico para comunidade bacteriana, percebeu-se uma maior densidade na presença do composto. Isso sugere que, na concentração utilizada, para muitas espécies presentes, o composto não foi tão tóxico e a complexidade metabólica bacteriana permitiu a utilização deste como fonte de nutrientes pelo processo de biodegradação. Apesar de inicialmente a diversidade bacteriana ter sido menor na presença do fipronil, ao final do experimento as diversidades tiveram o mesmo valor, sugerindo que a comunidade bacteriana conseguiu se recuperar quanto à diversidade de espécies e pode ser considerada resiliente ao distúrbio.

No artigo 3, a presença isolada da oxitetraciclina foi avaliada quanto a possíveis alterações na densidade e diversidade bacteriana. Contrariamente ao ocorrido pela presença do fipronil do artigo 2, a densidade bacteriana na presença do bactericida foi menor, como era esperado. Bactérias são organismos-alvo de ação do antibiótico, sendo portanto esperado maior sensibilidade da comunidade quando exposta a ele. Assim como ocorreu com a adição do fipronil, no final do experimento as diversidades bacterianas nas amostras sem adição de oxitetraciclina e com a presença desta foi similar. Porém, para este composto, foi feita análise de diversidade também na metade do tempo experimental. Nesta ocasião, surpreendentemente, foi encontrada maior diversidade na comunidade exposta a oxitetraciclina. Isto talvez seja resultado de um

efeito do antibiótico de diminuir a densidade populacional de algumas espécies com maior potencial competitivo, permitindo que outras espécies utilizem os recursos e se desenvolvam.

Analisando conjuntamente os dados dos artigos, fica evidente que a mistura dos compostos causou um efeito negativo mais acentuado a comunidade bacteriana. A diversidade bacteriana (Artigo 3) na presença de oxitetraciclina foi semelhante ao experimento controle. Porém, quando a oxitetraciclina foi adicionada a uma amostra que continha fipronil (Artigo 1), a diversidade bacteriana ficou menor. Além disso, o tratamento em que a diversidade sofreu maiores efeitos negativos foi o constituído por ambos compostos antimicrobianos e o fipronil. Isso mostra que a mistura de compostos pode intensificar a toxicidade aos organismos.

Esses fatos levam a algumas considerações. Primeiramente que esse tipo de abordagem precisa ser feita com experimentos que tenham um período amostral extenso, para que seja possível acompanhar os primeiros impactos e posteriormente possíveis recuperações. Segundo, em muitos tratamentos a comunidade bacteriana conseguiu se reestabelecer 70 dias pós-distúrbio. Porém, após a contaminação inicial, não ocorreu nenhum outro estresse desta origem. Isso pode ter facilitado à recuperação da comunidade. No ambiente natural normalmente há vários eventos de contaminação em curtos períodos de tempo, caracterizando um efeito crônico. Talvez com eventos múltiplos, a comunidade não tenha tempo de se recuperar e o impacto na densidade, diversidade e função ecológica bacteriana seja maior e mais visível. Sendo assim devem ser considerados, além de ensaios de toxicidade aguda, ensaios de toxicidade crônica para maior avaliar os efeitos dos tóxicos ao ambiente.

Para estudos futuros, quando possível, deve ser considerada a utilização de métodos genéticos mais avançados, que, além de identificar a existência de alterações nas espécies que constituem a comunidade bacteriana, também indiquem quais espécies são estas. Assim, ficará melhor a compreensão da sucessão ecológica bacteriana que ocorre após o distúrbio e também quais são os principais organismos sensíveis e resistentes aos eventos de contaminação.

ANEXO I

Sensibilidade microbiana ao imazalil e a oxitetraciclina

Objetivos

- Determinar a concentração de oxitetraciclina que causa efeito na densidade bacteriana heterotrófica da Represa do Beija-Flor;
- Determinar a concentração de imazalil que causa efeito na densidade fúngica da Represa do Beija-Flor;
- Escolher, entre meios de cultura, qual apresenta melhores resultados de crescimento bacteriano;
- Escolher, entre meios de cultura, qual apresenta melhores resultados de crescimento fúngico.

Material e Métodos

Para determinar quais concentrações de oxitetraciclina (OTC) e imazalil (IMZ) deveriam ser utilizadas nos experimentos, foi realizado um teste de sensibilidade da comunidade bacteriana e fúngica da Represa do Beija-Flor. Foi utilizado o método de diluição em ágar M7-A6 descrito pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2003), com modificações.

Pontos de Coleta

As amostras foram coletadas em três pontos. O primeiro situado próximo à margem da represa (S21°36.234' W47°47.849') e da desembocadura do córrego Beija-Flor; o segundo ponto está situado na região limnética da represa, (S21°36.288' W47°47.903'); já o terceiro ponto situa-se próximo à saída de água do sistema (S21°36.503' W47°48.059'). As amostras de água da represa dos três pontos foram coletadas na totalidade da coluna d'água de forma integrada, armazenadas em frascos de vidro âmbar e levadas ao laboratório refrigeradas a 4 °C.

Meios de Cultura

Os meios de cultura escolhidos para o crescimento de colônias bacterianas foram o ágar *Casein-Peptone-Starch* (CPS) e o ágar Nutriente (AN). Já para o crescimento

colonial fúngico, foram escolhidos os meios de cultura ágar Sabouraud (AS) e ágar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol (DRBC).

Concentrações testes de OTC e IMZ

Para testar a qual concentração de oxitetraciclina a comunidade é sensível, os meios de cultura para crescimento bacteriano (CPS e AN), depois de esterilizados, foram assepticamente enriquecidos com o antibiótico nas concentrações: 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 e 32,0 mg L⁻¹.

Já para testar a concentração de imazalil a qual a comunidade fúngica é sensível, os meios de cultura (AS e DRBC), depois de esterilizados, foram assepticamente enriquecidos com o fungicida nas concentrações 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 e 32,0 mg L⁻¹.

Inoculação

Foram inoculados 100 µL de água amostrada em cada ponto de coleta, por espalhamento (*spread plate*) em placas de Petri (100 x 15 mm) contendo meio de cultura sólido. Para avaliação do crescimento bacteriano, as placas foram incubadas a 27 °C, por 48 horas. Já para crescimento fúngico, as placas foram incubadas a 25°C, por 14 dias. Ao final dos períodos de incubação, foi realizada a contagem colonial das placas e os resultados foram expressos em UFC mL⁻¹.

Análises Estatísticas

A existência de replicabilidade entre os meios de cultura utilizados foi avaliada pelo coeficiente de correlação interclasse Kappa, usando o pacote estatístico BioEstat versão 5.3 (AYRES et al., 2007). O resultado foi classificado conforme padrões estabelecidos por Landis & Koch (1977) (Tabela 1).

Tabela 1 Interpretação do valor Kappa (k) proposto por Landis & Koch (1977)

k	replicabilidade
0,00 > k ≤ 0,21	Fraca
0,21 > k ≤ 0,41	Sofrível
0,41 > k ≤ 0,61	Regular
0,61 > k ≤ 0,81	Boa
0,81 > k ≤ 1,00	Ótima

Para identificar diferenças na densidade e riqueza microbiana, foi realizado o teste de variância de Kruskal-Wallis ($p= 0,05$) utilizando o pacote estatístico PAST versão 2.17c (Hammer et al. 2001).

Resultados

Replicabilidade entre os meios de cultura

Para identificar existência de replicabilidade dos dados de densidade e riqueza bacteriana e fúngica entre os diferentes meios de cultura analisados, foi realizado o teste de correlação interclasse.

Os meios de cultura para crescimento bacteriano AN e CPS, tanto para os dados de densidade quanto para os dados de riqueza, obtiveram resultado “ótimo” de replicabilidade em todos os pontos amostrados. (Tabela 2).

Tabela 2 Resultados dos testes de correlação interclasse kappa, para dados de densidade e riqueza, entre os meios de cultura para crescimento bacteriano (AN e CPS)

	NA x CPS (densidade)			NA x CPS (riqueza)		
	P1	P1	P1	P1	P2	P3
<i>p</i>	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
<i>k</i>	0,8813	0,8661	0,8661	0,8661	0,8384	0,9346
Replicabilidade	Ótima	Ótima	Ótima	Ótima	Ótima	Ótima

Já meios de cultura para crescimento fúngico AS e CRBS, para os dados de densidade, apresentaram resultados de replicabilidade “sofrível” em todos os pontos. Quanto à análise de riqueza, apenas no P2 a replicabilidade foi considerada “regular”, sendo as demais categorizadas como “sofrível” (Tabela 3).

Tabela 3 Resultados dos testes de correlação interclasse kappa, para dados de densidade e riqueza, entre os meios de cultura para crescimento fúngico (AS e CRCB)

	AS x CRCB (densidade)			AS x CRCB(riqueza)		
	P1	P1	P1	P1	P2	P3
<i>p</i>	0,0844	0,0093	0,0713	0,0435	0,0748	0,0643
<i>k</i>	0,28	0,4616	0,2974	0,3441	0,2925	0,3077
Replicabilidade	sofrível	regular	Sofrível	sofrível	sofrível	sofrível

Sensibilidade bacteriana a oxitetraciclina

Para determinar qual concentração de oxitetraciclina causa efeito na densidade bacteriana, foi realizado teste de variância ANOVA *one-way* entre os tratamentos constituídos por diferentes concentrações do antibiótico.

Tanto em meio de cultura AN quanto em meio CPS, a menor concentração que causou efeito significativo a densidade bacteriana foi 2,0 mg L⁻¹ (p= 0,0132), sendo esta a escolhida para ser utilizada nos experimentos em microcosmos.

Sensibilidade fúngica ao imazalil

Para determinar qual concentração de imazalil causa efeito na densidade fúngica, foi realizado teste de variância ANOVA entre os tratamentos constituídos por diferentes concentrações do antibiótico.

Diferentemente do ocorrido entre os meios de cultura para crescimento bacteriano, os meios de cultura DRBC e AS sugeriram concentrações de efeito diferentes para densidade fúngica.

A densidade fúngica que teve crescimento no meio DRBC apresentou sensibilidade ao composto imazalil a partir da concentração 8 mg L⁻¹ (ANOVA-*oneway*; p= 0,0056). Em relação à densidade fúngica proveniente do crescimento em meio AS, houve diferença significativa na concentração a partir da concentração 2 mg L⁻¹ (ANOVA-*oneway*; p= 0,0131).

Diante deste impasse, já esperado uma vez que os meios de cultura apresentaram replicabilidade “sofrível” ao teste de correlação interclasse Kappa, optou-se em utilizar nos experimentos uma concentração de efeito intermediária em relação às obtidas nos diferentes meios de cultura DRBC e AS, resultando na concentração de 4,0 mg L⁻¹.

Referências Bibliográficas

Ayres M et al. (2007) BIOESTAT Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências BioMédicas. Mamirauá.

Landis JR, Koch GG (1977) The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics, Washington, v.33, p.159-174, 1977.

Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia 4:1-9. Available from: http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf

ANEXO II

Método de Extração e Quantificação da Oxitetraciclina

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 μ m) 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 μ L e a fase móvel foi composta por tampão de acetato de sódio anidro (0,375 mol L⁻¹), cloreto de cálcio heptahidratado (0,0175 mol L⁻¹) e Na₂EDTA (0,0125 mol L⁻¹) a pH 7,0 (MAMANI; REYES; RATH, 2009), como fase aquosa. A fase orgânica foi composta por álcool metílico. A proporção das fases aquosa e orgânica foi de 60:40 (v v⁻¹), respectivamente, em fluxo de 1 mL min⁻¹.

Tratamento das amostras e extração de OTC em água

As amostras de água foram filtradas em membrana de acetato de celulose, diâmetro de 47 mm e poro de 0,45 μ m (Whatman), e enriquecidas com OTC em concentrações que variaram de 0,25 a 2,5 mg L⁻¹. Foram adicionados 0,02 mol L⁻¹ de Na₂EDTA nas amostras e estas tiveram o pH ajustado para 3,4 com ácido fórmico (5%). A extração foi feita em cartuchos de polímero de estireno divinilbenzeno com superfície modificada, Strata-X (200 mg, 3 mL), condicionados com 5 mL de álcool metílico 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 álcool metílico a 2% e secos sob vácuo por 5 minutos. A eluição foi feita com 10 mL de álcool metílico. Os extratos obtidos foram secos com ar comprimido e reconstituídos para 1 mL em tampão, mesmo usado na fase móvel aquosa.