



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – PROAMB

Gerusa Leite Caetano

**AVALIAÇÃO DE ELEMENTOS GENÉTICOS DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS
EM ÁREA SOB INFLUÊNCIA DA FERTIRRIGAÇÃO COM EFLUENTE TRATADO
DE UMA GRANJA DE SUINOCULTURA**

Ouro Preto, MG

2022

Gerusa Leite Caetano

**AVALIAÇÃO DE ELEMENTOS GENÉTICOS DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS
EM SOLO IRRIGADO COM EFLUENTE TRATADO DE SUINOCULTURA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito a obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental.

Área de concentração: Tecnologias Ambientais

Orientadora: Silvana de Queiroz Silva

Ouro Preto, MG
2022

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

C128a Caetano, Gerusa Leite.

Avaliação de elementos genéticos de resistência a antibióticos em solo irrigado com efluente tratado de suinocultura. [manuscrito] / Gerusa Leite Caetano. GERUSA LEITE CAETANO. - 2021.
88 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Silvana de Queiroz Silva.
Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto. Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental.
Área de Concentração: Tecnologias Ambientais.

1. Drogas - Resistência em micro-organismos. 2. Suínos - Dejetos suínos. 3. Solo - Uso. I. CAETANO, GERUSA LEITE. II. Silva, Silvana de Queiroz. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 502:004

Bibliotecário(a) Responsável: Maristela Sanches Lima Mesquita - CRB-1716



FOLHA DE APROVAÇÃO

Gerusa Leite Caetano

Avaliação de elementos genéticos de resistência a antibióticos em área sob influência da fertirrigação com efluente tratado de uma granja de suinocultura

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Aprovada em 30 de setembro de 2021

Membros da banca

Dra. Silvana de Queiroz Silva - Orientador(a) / Universidade Federal de Ouro Preto
Dra. Alessandra Rodrigues Kozovits - Examinadora / Universidade Federal de Ouro Preto
Dra. Elayne Cristina Machado - Examinadora / Universidade Federal de Minas Gerais

Dra. Silvana de Queiroz Silva, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 15/02/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Silvana de Queiroz Silva**, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR, em 16/02/2022, às 08:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0280263** e o código CRC **1B4D655A**.

Ao Eterno Pai, à Maria, João e
Joelma, a melhor família do universo.

AGRADECIMENTOS

Ao Pai que acreditou no meu potencial, me capacitou e trouxe anjos por onde eu passei para me dar o suporte necessário. À minha querida família: pai (João), mãe (Maria) e Joelma (irmã) que me ensinaram o amor incondicional, me deram total apoio, lembrando sempre do lado bom das coisas, e que me socorreram nas horas de desespero, tristeza sempre trazendo a leveza e a alegria de volta ao meu coração. Vocês são a maior prova da presença de Deus na minha vida.

Aos meus amigos e amigas, os velhos, os novos que acabei conhecendo em Ouro Preto, cada qual com um lugar garantido no meu coração. Não vou citar nomes, pois eu sei que posso esquecer de alguém. Às meninas que me receberam na primeira casa onde morei quando saí da minha cidade: Aline, Paulinha e Nath. Obrigada pelo suporte e pelas risadas. Agradeço às meninas da República Oasis com quem tive o prazer de conviver e que me ensinaram muito.

Aos professores do PROAMB que ensinaram cada disciplina com muito amor, dedicação e excelência, pelo Colegiado que me deu sempre suporte em minhas decisões e colaborou para que eu fizesse um bom mestrado. Aos colegas do PROAMB que me deram um grande auxílio nas disciplinas, nas dúvidas, e fizeram da UFOP um lugar mais aconchegante. Ao pessoal do LBTM que deram suporte e me auxiliaram nas atividades e claro, por me levarem nas trilhas. Aos colegas do LQTA que me ajudaram muito nas análises físico-químicas.

À Profa. Dra Silvana Queiróz Silva, minha orientadora, que me aceitou de bom coração. Obrigada pelo apoio e pela simplicidade em ensinar. À doutoranda Andrêssa que me acompanhou nos trabalhos de campo, ajudou muito nas análises de PCR e sempre respondeu às minhas muitas dúvidas com prontidão, obrigada pela paciência. Agradeço à IC Lucimeire, que deu total suporte para nas análises biomoleculares. À IC Letícia Dias, pelo apoio nas análises de BRAs. À UFMG que colaborou também com o material necessário às análises biomoleculares.

Pela ajuda da Gorceix na granulometria do solo, em especial ao Renato e aos demais colaboradores que separaram um tempo para me ajudar, mesmo quando estavam muito ocupados.

Aos motoristas da UFOP que me levaram à campo em segurança, aos porteiros, vizinhos, às faxineiras cozinheiras, ao Kallil, que me ajudou nas estatísticas e na interpretação dos dados. Ao Moisés que me ajudou no finalzinho do mestrado e me deu total apoio no treinamento da minha apresentação. À Maria Pimpim (*in memorian*) que sempre me via estudando na garagem e mandava um “Deus te abençoe em seus estudos”, suas orações valeram demais! Pela Tibitriz (*in memorian*),

que sempre soube que eu iria sair de Nova Era de alguma forma (hihi). Pela família da Tida, que me acolheu como parte da família em Ouro Preto. Pela Dona Marta, minha avó do coração que me ensinou que a vida é simples e bonita.

Agradeço pelo suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (código de financiamento nº 001), Fundação Nacional de Saúde (FUNASA - código do projeto: 25100.015.575;2017-86), Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq- código 423101/2018-8), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).e à Universidade Federal de Ouro Preto, pelo ensino de qualidade, pela gestão, apoio aos estudantes, à cultura, pela sua importância em nossa região e por ser a minha segunda casa em Ouro Preto.

RESUMO

O efluente oriundo do confinamento de suínos é fonte potencial de genes de resistência a antibióticos (GRAs), que podem ser disseminados no ambiente por meio das práticas de destinação final do efluente tratado, como a aplicação em solos, prática muito comum na suinocultura. Para investigar essa hipótese, uma granja de suinocultura que concede seu efluente tratado para irrigação de milho, foi escolhida para monitoramento de GRAs, e de parâmetros físico-químicos, além do isolamento de bactérias resistentes a norfloxacin (BRN). Foram investigados a ocorrência e abundância dos genes de resistência à beta-lactâmicos (*blaTEM*), macrolídeos (*ermB*), quinolonas (*qnrB*), tetraciclina (*tetA*) e sulfonamidas (*sulI*), além do elemento genético móvel integrase classe 1 (*intI1*) e do gene que estima bactérias totais (RNAr 16S), em amostras do efluente tratado (ET), do solo fertirrigado (S1), do solo sem histórico de fertirrigação direta (S2) e de um açude (A), ambos localizados à jusante da área fertirrigada. Adicionalmente, realizou-se a quantificação de carbono orgânico total (COT), nitrogênio total (NT) e pH em todas as amostras estudadas. Foram realizadas de quatro a cinco campanhas amostrais, com a coleta de 1 L efluente tratado, cinco amostras de 250 g de cada solo (S1 e S2), além de 2L de água do açude. A quantificação dos genes, foi realizada por qPCR com os primers correspondentes a cada gene. Foram realizados testes estatísticos para verificar a normalidade dos dados e comparar as amostras. A concentração média do COT e NT no efluente tratado foi de 713,2 mg/L e 2.434,5 mg/L, respectivamente. Conforme esperado, a concentração desses elementos foi maior no solo fertirrigado em comparação ao não fertirrigado ($p < 0,05$). A concentração de NT foi de 0,3 g/kg e 0,12 g/kg, respectivamente em S1 e S2, enquanto a concentração de COT foi de 28,6 e 17,8 respectivamente. S1 também teve o pH levemente menor que S2 ($6,3 \pm 0,3$ e $8,0 \pm 0,5$, $p < 0,05$, respectivamente). Já no açude, o teor médio de COT foi de $13,6 \pm 8,5$ mg/L e de NT, foi de $3,0 \pm 0,7$ mg/L. Todos os genes investigados (*ermB*, *tetA*, *sulI*, *intI1*, *qnrB*, *blaTEM*) e o elemento genético móvel *intI1* foram detectados em todas as campanhas amostrais de S1, S2, A e ET. Todavia, o gene *qnrB* esteve abaixo do limite de detecção do método analítico em ambos os solos em algumas campanhas amostrais. A abundância absoluta de GRAs referente à média de todas as coletas foi de aproximadamente $10,5 \log_{10}$ no S1, $9,6 \log_{10}$ no S2, efluente tratado de $6,62 \log_{10}$ e do açude $3,62 \log_{10}$. O gene *sulI* foi o mais abundante entre as amostras, com exceção das amostras do açude, em que prevaleceram maior abundância do gene *blaTEM*. A abundância relativa variou de $-0,90$ a $2,23 \log_{10}$ no efluente tratado, $-3,22$ a $0,69$ nas

amostras de água do açude, -3,32 a 0,47 log₁₀ no S1 e de -4,06 a -0,43 log₁₀ cópias/16S rRNA no S2. Comparativamente, o gene *sulI* e *tetA* foram estatisticamente mais abundantes em S1 do que em S2, em todas as coletas, enquanto para outros genes, as variações nos resultados entre coletas não permitem uma conclusão clara. Similarmente ao observado para os genes *sulI* e *tetA*, valores maiores de bactérias resistentes a norfloxacin no solo fertirrigado em relação ao solo S2 foram observados (aumento de 4x, p<0,05). Assim, os resultados obtidos neste trabalho sugerem um efeito direto da fertirrigação do solo no aumento de alguns GRAs e de BRN. Contudo, um aspecto positivo observado está na tendência de diminuição do total de GRAs na amostra do açude à jusante à área fertirrigada, sugerindo um decaimento natural de GRA no ambiente. No entanto, mais estudos são necessários para possibilitar uma melhor compreensão do impacto da fertirrigação na disseminação de elementos de resistência a antibióticos em solo e outras matrizes ambientais, bem como no potencial de transferência desses GRAs à microbiota ambiental.

Palavras-chave: elementos de resistência, dejetos suínos, solo.

ABSTRACT

The effluent from the confinement of swine is a potential source of antibiotic resistance genes (ARGs), which can be disseminated in the environment through the practices of final disposal of the treated effluent, such as application in soils, a very common practice in swine farming. To investigate this hypothesis, a swine farm that uses its treated effluent for corn irrigation was chosen to monitor ARGs and physicochemical parameters, in addition to the isolation of norfloxacin-resistant bacteria (NRB). The occurrence and abundance of resistance genes to beta-lactams (*blaTEM*), macrolides (*ermB*), quinolones (*qnrB*), tetracyclines (*tetA*) and sulfonamides (*sulI*), in addition to the mobile genetic element integrase class 1 (*intI1*) and of the gene that estimates total bacteria (*16S rRNA*), in samples of treated effluent (ET), fertigated soil (S1), soil with no history of direct fertigation (S2) and a weir (A), both located downstream of the fertigated area. Additionally, the quantification of total organic carbon (TOC), total nitrogen (TN) and pH was performed in all samples studied. Four to five sampling campaigns were carried out, with the collection of 1 L of treated effluent, five samples of 250 g of each soil (S1 and S2), in addition to 2L of water from the weir. The quantification of genes was performed by qPCR with primers corresponding to each gene. Statistical tests were performed to verify the normality of the data and to compare the samples. The average concentration of TOC and TN in the treated effluent was 713.2 mg/L and 2,434.5 mg/L, respectively. As expected, the concentration of these elements was higher in the fertigated soil compared to the non-fertigated soil ($p < 0.05$). TN concentration was 0.3 g/kg and 0.12 g/kg, respectively in S1 and S2, while TOC concentration was 28.6 and 17.8 respectively. S1 also had a slightly lower pH than S2 (6.3 ± 0.3 and 8.0 ± 0.5 , $p < 0.05$, respectively). In the weir, the average TOC content was 13.6 ± 8.5 mg/L and TN was 3.0 ± 0.7 mg/L. All investigated genes (*ermB*, *tetA*, *sulI*, *intI1*, *qnrB*, *blaTEM*) and the mobile genetic element *intI1* were detected in all sampling campaigns of S1, S2, A and ET. However, the *qnrB* gene was below the detection limit of the analytical method in both soils in some sampling campaigns. The absolute abundance of ARGs referring to the average of all collections was approximately $10.5 \log_{10}$ in S1, $9.6 \log_{10}$ in S2, treated effluent of $6.62 \log_{10}$ and from the weir $3.62 \log_{10}$. The *sulI* gene was the most abundant among the samples, with the exception of the weir samples, in which the *blaTEM* gene was more abundant. The relative abundance ranged from -0.90 to $2.23 \log_{10}$ in the treated effluent, -3.22 to 0.69 in the water samples from the weir, -3.32 to $0.47 \log_{10}$ in the S1 and from -

4.06 a $-0.43 \log_{10}$ copies/16S rRNA in S2. Comparatively, the *sulI* and *tetA* gene were statistically more abundant in S1 than in S2, in all collections, while for other genes, the variations in the results between collections do not allow a clear conclusion. Similar to what was observed for *sulI* and *tetA* genes, higher values of norfloxacin-resistant bacteria in fertigated soil compared to S2 soil were observed (4x increase, $p < 0.05$). Thus, the results obtained in this work suggest a direct effect of soil fertigation on the increase of some ARGs and NRB. However, a positive aspect observed is the tendency of decreasing total ARGs in the sample from the weir downstream to the fertigated area, suggesting a natural decay of ARGs in the environment. However, further studies are needed to provide a better understanding of the impact of fertigation on the spread of antibiotic resistance elements in soil and other environmental matrices, as well as on the potential for the transfer of these ARGs to the environmental microbiota.

Keywords: resistance elements, swine manure, soil.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1 SUINOCULTURA NO BRASIL	22
3.2 RECOMENDAÇÕES DE REÚSO DE EFLUENTES DA SUINOCULTURA NO SOLO	24
3.3 TRATAMENTO DO EFLUENTE LÍQUIDO DA SUINOCULTURA	27
3.4 ANTIBIÓTICOS E SUINOCULTURA	28
3.5 ANTIBIÓTICO NORFLOXACINA E BACTÉRIAS RESISTENTES	31
3.6 MECANISMOS BIOQUÍMICOS DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS	31
3.6.1 Gene <i>ermB</i>	32
3.6.2 Gene <i>sul</i>	33
3.6.3 Gene <i>tet</i>	33
3.6.4 Gene <i>blaTEM</i>	34
3.6.5 Gene <i>qnrB</i>	34
3.6.6 Elemento móvel integrase	35
3.7 GENES DE RESISTÊNCIA EM AMOSTRAS AMBIENTAIS	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 ÁREA DE ESTUDO	40
4.2 AMOSTRAGEM DO SOLO E DE ÁGUA SUPERFICIAL	42
4.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS DE SOLO E EFLUENTE TRATADO	43
4.4 ANÁLISE DOS ELEMENTOS GENÉTICOS DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS	44
4.5 ISOLAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES A NORFLOXACINA	48
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DAS AMOSTRAS DO EFLUENTE TRATADO, SOLOS E ÁGUA DO AÇUDE	49
5.1.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EFLUENTE TRATADO (ET)	49
5.1.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS DOS SOLOS	50
5.1.3 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS DE ÁGUA DO AÇUDE	55
5.2 ABUNDÂNCIA DOS EGR A ANTIBIÓTICOS	55
5.2.1 ANÁLISE DE EGR NO EFLUENTE TRATADO	56
5.2.2 ANÁLISE DE EGR NAS AMOSTRAS DE SOLO	57
5.2.3 ELEMENTOS GENÉTICOS DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS NA ÁGUA DO AÇUDE	60
5.2.4 COMPARAÇÃO DA ABUNDÂNCIA DE GENES DE RESISTÊNCIA ENTRE AMOSTRAS DE SOLO, EFLUENTE TRATADO E DE ÁGUA DO AÇUDE	61
5.3.1 CORRELAÇÃO ENTRE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS E A INTEGRASE INT1 NAS AMOSTRAS DO SOLO 1 E SOLO 2	66

<i>5.3.2 CORRELAÇÃO ENTRE ELEMENTOS GENÉTICOS DE RESISTÊNCIA E PARÂMETROS COT, NT, PH E GRANULOMETRIA NAS AMOSTRAS DO SOLO 1 E SOLO 2</i>	68
<i>5.4 ANÁLISE DAS COMPONENTES PRINCIPAIS</i>	69
<i>5.5 ANÁLISE DO ISOLAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES A NORFLOXACINA</i>	71
6.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS	73

1 INTRODUÇÃO

Novos mecanismos de resistência vêm surgindo e se disseminando em escala global, ameaçando o tratamento de doenças comuns como pneumonia, tuberculose e gonorreia. Tratamentos com antibióticos tornam-se ineficazes em muitos casos, pela diminuição da eficácia desses medicamentos através da resistência adquirida (WHO, 2018).

Segundo projeções da (OMS) Organização Mundial da Saúde, o uso de antibióticos será responsável por dez milhões de óbitos até 2050 e será associada a maior causa de mortes, número maior do que o atribuído ao câncer (oito milhões) e a aos acidentes de trânsito (um milhão e duzentas mil mortes). O aumento contínuo da resistência a antimicrobianos custará ao mundo cerca de 100 trilhões de dólares americanos nesse cenário, a resistência a antibióticos causará prejuízos financeiros lastimáveis, como na área da saúde e produção de alimentos (O'NEILL, 2014).

Dessa forma, a resistência a antimicrobianos está entre os maiores riscos para a saúde global, encaixando-se no conceito de Saúde Única, que integra saúde humana, animal e ambiental e propõe a implementação de políticas, legislação e programas, a fim de possibilitar melhores resultados em saúde pública e minimizar os riscos globais (CFMV, 2020). A resistência a antimicrobianos ocorre quando certas bactérias são capazes de reproduzir mesmo na presença dos antibióticos em níveis terapêuticos (TAVARES *et al.*, 2008; WHO, 2014).

Antimicrobianos são utilizados na medicina veterinária na prevenção de doenças, como promotores de crescimento, no controle e tratamento de doenças. Estima-se que aproximadamente 70% dos antibióticos no mundo são utilizados na produção animal, sendo frequentemente prescritos em granjas de suínos (ZEINELDIN *et al.*, 2019). De modo geral, a maior parte desse tipo de medicamento não é metabolizada nos organismos dos animais, sendo eliminada através da urina e das fezes (NEGREANU *et al.*, 2012).

É importante ressaltar que a microbiota intestinal de animais compõe uma importante reserva de (GRA) Genes de Resistência a Antibióticos entre os reservatórios ambientais que contribuem para a generalização da resistência antimicrobiana. Acredita-se que a administração de antibióticos promova pressão seletiva no trato gastrointestinal dos animais, selecionando e enriquecendo bactérias resistentes a antibióticos (ALLEN *et al.*, 2014). Tal fenômeno pode trazer consequências danosas à saúde humana e ambiental como um todo, uma vez que o reúso de efluentes da pecuária tornou-se uma atividade amplamente difundida, sendo uma prática comum na suinocultura como no reaproveitamento do efluente tratado para irrigação (ABPA, 2020).

O problema do reuso do efluente de atividade pecuária está na capacidade de remoção total de patógenos advindos principalmente da limpeza das áreas de criação de animais (BETTIOL *et al.*, 2000). Os tratamentos convencionais de efluentes não foram desenvolvidos para remover contaminantes em pequena concentração como antibióticos, genes de resistência e bactérias resistentes (ARAÚJO *et al.*, 2020). A remoção ou redução desses poluentes depende diretamente do tipo de tecnologia utilizada, tamanho e composição do efluente (CHEN *et al.*, 2013; OSIŃSKA *et al.*, 2017).

O reuso de água não potável para fins agrícolas está previsto na Resolução CNRH nº 54/05, que ressalta sua importância devido ao aumento dos gastos para tratamento de água, considerando o uso para abastecimento público e a escassez de águas em algumas regiões do território brasileiro. Essa prática pode contribuir para a redução da demanda de água potável no cultivo agrícola e auxiliar na introdução de nutrientes próprios das águas residuárias (ABPA, 2020).

Na legislação brasileira são solicitadas comumente análises de parâmetros biológicos referentes aos agentes patogênicos *Escherichia coli* e ovos viáveis de helmintos em biossólidos e efluentes destinados ao uso em solo. Contudo, a análise da presença de (BRA) Bactérias Resistentes a Antibióticos e GRAs é um tema ainda não contemplado para fins de diagnóstico ambiental no Brasil (CONAMA, 2020).

Devido à ameaça da resistência antimicrobiana, o tema foi contemplado recentemente no regulamento do Parlamento Europeu e do Conselho, que cita o monitoramento da resistência microbiana como requisito suplementar, e principalmente quando houver evidências científicas de riscos no conceito da Saúde Única (UNIÃO EUROPEIA, 2020).

Perante a problemática da resistência antimicrobiana, a OMS desenvolveu, em 2015, o Plano de Ação Global sobre Resistência Antimicrobiana. Entre os principais objetivos do plano, está melhoria na compreensão sobre a resistência a antimicrobianos através do desenvolvimento de pesquisas acerca da temática.

Nessa perspectiva, o Ministério da Saúde tem incentivado o fortalecimento de conhecimentos sobre a resistência antimicrobiana, em seu Plano de Ação Global de Resistência aos Antimicrobianos (BRASIL, 2019). Dessa forma, a pesquisa torna-se instrumento indispensável para averiguação da possibilidade de disseminação da resistência no meio ambiente para auxiliar no entendimento e na tomada de decisões para elaboração de ações preventivas e corretivas.

Uma das hipóteses investigadas nesse estudo destaca a possibilidade de disseminação de genes de resistência a antibióticos no solo após o lançamento de efluente de suinocultura. Há também a possibilidade de transferência horizontal dos GRA por meio das bactérias no solo pelas matrizes ambientais e consequente transporte de genes ativos ou (EGM) Elementos Genéticos Móveis -EGM a cursos hídricos de abastecimento.

Até o momento, não existe um consenso na literatura a respeito do risco da disseminação de GRAs a partir da aplicação de efluentes tratados proveniente de produção animal, deixando incerteza sobre sua permanência no solo e disseminação no meio ambiente. Assim, considerando que no Brasil o reuso de efluentes para fins agrícolas é recomendado, é importante verificar a ocorrência de genes de resistência antimicrobiana em solos próximos à área de manejos agrícolas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a presença de elementos genéticos de resistência a antibióticos em amostras de solo submetidos a irrigação constante com efluente de suinocultura tratado, de solo que não recebeu a fertirrigação direta, de efluente tratado e de água de um açude adjacente à área de confinamento dos suínos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Mensurar os parâmetros físico-químicos pH, (NT) Nitrogênio Total e (COT) Carbono Orgânico Total das amostras estudadas.
- b) Quantificar os genes de resistência a antibióticos *blaTEM*, *ermB*, *qnrB*, *sulI* e *tetA*, além do gene referente a elementos genéticos móveis *intI1* e o gene do domínio *Bacteria* RNAr 16S, em amostras de solo e no efluente tratado;
- c) Comparar a quantidade de (BRN) Bactérias Resistentes a Norfloxacin na amostras de solo em uma campanha amostral.
- d) Verificar a ocorrência de correlação entre os parâmetros físico-químicos e as abundâncias dos genes nos solos estudados.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 SUINOCULTURA NO BRASIL

A produção de suínos vem contribuindo de forma significativa na economia do país, com cerca de 1.597 milhões de dólares somente no ano de 2019. Juntas, a avicultura e suinocultura foram responsáveis pela geração de 4,1 milhões de empregos e um (PIB) Produto Interno Bruto de 120 bilhões para o país no ano de 2020.

O Brasil é o 4º produtor mundial de suínos, com estimativa de produção em 2021 de 4.25 milhões de toneladas. Conforme o Relatório da (ABPA) Associação Brasileira de Proteína Animal, houve aumento de 36.53% na exportação de carne suína no ano de 2020 em relação à 2018, sendo o estado de Minas Gerais o maior consumidor de carne suína no país (ABPA, 2020; BNDES, 2017; EMBRAPA Suínos e Aves, 2021).

Paralelamente à importância econômica da suinocultura, tem-se também o aumento de dejetos gerados na produção em áreas de confinamento. Uma unidade de produção de leitões gera um volume de dejetos equivalente a 22,8 L/animal/dia e consome 35,3 L/animal/dia de água, levando em conta que somente no ano de 2019, mais de dois milhões de cabeças suínas foram alojadas no território brasileiro (ABPA, 2021).

Em áreas de confinamento de suínos usualmente há elevada concentração de animais por área, gerando assim um volume concentrado de estrume, composto por fezes, urina, pelos, carcaças-quando a atividade possui um sistema de abatedouro-, excedentes de rações entre outros materiais advindos dos processos produtivos. Assim, o efluente bruto, resultante da limpeza dos dejetos constitui uma fonte potencial de impacto no ecossistema local devido à alta carga de (DBO) Demanda Bioquímica de Oxigênio e (DQO) Demanda Química de Oxigênio e nutrientes e deve ser tratado antes do lançamento em cursos hídricos e/ou solo (MAPA, 2016; OLIVEIRA, 2021).

3.2 REUSO DE EFLUENTES NA AGRICULTURA

A agricultura é a maior consumidora de água potável no mundo, responsável por 70% do uso. O aumento da demanda hídrica fruto do crescimento populacional, além do atual estresse hídrico no cenário mundial tornam as práticas de racionamento e recirculação de água, imprescindíveis (SAPKOTA, 2019; WORLD BANK GROUP, 2016).

Visando atender a atual demanda hídrica, a OMS estimula o emprego de águas residuárias na agricultura: além da economia de água potável, a prática da fertirrigação por vezes supre a carência de nutrientes indispensáveis ao crescimento das plantas como nitrogênio, fósforo, cálcio, potássio entre outros podendo auxiliar na economia de fertilizantes convencionais em muitos casos (WHO, 2006).

Portanto, a fertirrigação com efluente tratado oriundo do estrume gerado pela produção animal vem a ser uma das alternativas mais adotadas, constituindo-se em um método de aplicação de fertilizantes por meio da água da irrigação. Para esse fim, torna-se necessário o conhecimento da mobilidade dos nutrientes no solo assim como as necessidades nutricionais de cada cultura (SENAR, 2019). A fertirrigação também melhora a capacidade de retenção de água no solo além da ativação da microbiana do ambiente à longo prazo, contribuindo com a resistência da vegetação a pragas e doenças, devido à matéria orgânica atribuída a esse resíduo (MARCHI, 2010).

O efluente tratado da suinocultura, assim como qualquer efluente de produção animal, tem composição heterogênea em dimensão e volume, o que torna complexa a determinação da estrutura química da matéria orgânica dissolvida nesse resíduo. Já foi observado a presença de grupos funcionais nitrogenados em efluentes derivados da produção de suínos, que podem remeter à liberação de nitrogênio e posterior contribuição desse elemento para o solo (BOSCO *et al*, 2016).

Entretanto, deve-se proporcionar o tratamento devidamente seguro de efluentes para uso em ambiente agrícola, já que pode haver riscos associados à prática. Alguns estudos em granjas de suínos no Brasil, verificaram alterações significativas de fósforo, oxigênio dissolvido, coliformes termotolerantes, e alto índice de eutrofização em uma bacia hidrográfica sob influência da suinocultura (BOSCO *et al*, 2016); CANODÁ, 2017).

O uso de excrementos, compostos e biofertilizantes de origem animal é permitido no Brasil para uso como fertilizantes e corretivos em sistemas de produção orgânica, desde que os resíduos sejam compostados e bioestabilizados. (MAPA, 2020). Contudo, ao contrário dos fertilizantes químicos, formulados de forma específica para cada cultura, dejetos animais podem conter vários minerais em diferentes quantificações, em relação à capacidade de absorção pela cultura. Deste modo, uma das alternativas é a limitação da quantidade de dejetos pelo nutriente exigido em menor quantidade pela planta como cobre, zinco (muito presentes no esterco) e nitrogênio (quando a concentração de micronutrientes é menor). É recomendado o uso de dejetos com menores quantidades de zinco, cobre, fósforo, nitrogênio, antibióticos e outros medicamentos. Para

compostagem ou cobertura de solo, recomenda-se relação de C:N na proporção de 18:1, 10:1 e de 19:1 para esterco bovino, de aves e suíno, respectivamente (2006KIEHL, 1985; SPADOTTO *et al*).

3.2 RECOMENDAÇÕES DE REÚSO DE EFLUENTES DA SUINOCULTURA NO SOLO

A Resolução n° 54/2005 do (CNRH) Conselho Nacional de Recursos Hídricos, atribui ao Sistema Nacional de Recursos Hídricos a avaliação das práticas de reuso de água, abrangendo em seu terceiro artigo a aplicação de água não potável para produção agrícola, assim como elaboração de instrumentos regulatórios e incentivos para a modalidade. Além disso, a Resolução CNRH n° 121/2010 prevê o uso para fins agrícolas e florestais, desde que não exponha riscos ou cause dano ambiental ao meio ambiente e à saúde da população (CNRH, 2010).

Conforme a Resolução (CONAMA) Conselho Nacional do Meio Ambiente n° 430/2011 e a Deliberação Normativa Conjunta COPAM/CERH-MG n° 01/2008, os parâmetros e padrões para lançamento em solo não necessitam estar em conformidade com os exigidos para lançamento nos cursos hídricos, não havendo, contudo, poluição e contaminação dos recursos hídricos adjacentes. Entre os parâmetros orientadores listados na norma estão pH, temperatura, demanda bioquímica de oxigênio- DBO, coliformes termotolerantes, entre outros.

A Resolução CONAMA 498/2020, referente à aplicação de biossólidos em solo, lista entre os critérios para análise microbiológica ovos viáveis de helmintos e *Escherichia coli* por grama de sólidos totais (g¹ de ST). A legislação brasileira não dispõe ainda de leis específicas em nível federal que limitem a aplicação de efluentes derivados de Sistemas Intensivos de Produção Animal – SIPA no solo ou que prevê a análise de BRAs e GRAs para fins de diagnóstico ambiental.

Na modalidade de reuso de efluente de produção animal, há uma iniciativa do Estado do Paraná, no anexo III da Resolução para licenciamento da suinocultura, que contém critérios para utilização agrícola dos dejetos suínos (SEDEST, 2020), além de duas outras legislações estaduais específicas para esse fim de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, considerando que estes estados são os maiores produtores de suínos no Brasil. Contudo, ainda há uma lacuna quanto à especificidade e o reaproveitamento desse tipo de resíduo (ARANTES, 2020).

Os resíduos da suinocultura são utilizados em forma de estrume bruto (sem tratamento) e tratado (após tratamento), com a fertirrigação, sendo um dos métodos mais utilizados para evitar o lançamento direto do efluente tratado nos corpos hídricos. Há estudos que recomendam cálculos

para uso de dejetos líquidos de suínos, considerando um teor de nitrogênio, fosfato e potássio (MIYAZAWA *et al*, 2015). Porém, faz-se necessário realizar um memorial de cálculo específico para atendimento de cada atividade para que não seja aplicada uma taxa maior de nutrientes no solo do que a necessária e gerar um impacto negativo no meio.

Consoante à classificação da (IN) Instrução Normativa 61/2020, como fertilizante orgânico, o resíduo da suinocultura enquadra-se como “Classe A”, desde que seja isento de contaminantes e seguro para uso na agricultura. O Art.9º dessa normativa, que cita a prática da fertirrigação, contempla valores mínimos de carbono orgânico (3%) e macronutrientes primários (nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio: 1%; cobre, ferro, manganês: 0,02 % ; zinco e cloro :0,1%; cobalto molibdênio, níquel :0,005%; selênio: 0,003%; silício :0,05% e boro :0,01% (MAPA, 2020).

Em Minas Gerais, a Deliberação Normativa do (CERH-MG) Conselho Estadual de Recursos Hídricos –permite uso de esgoto domésticos na fertirrigação superficial localizada ou por aspersão, compreendendo além dos critérios físico-químicos, a análise de coliformes termotolerantes (CERH-MG, 2020). No Ceará foi instituído em 2016 um selo de reúso para atividades internas e externas, com um dos requisitos mínimos para sua obtenção, a licença ambiental de funcionamento (CEARÁ, 2016).

De modo geral, os padrões utilizados para o reúso nos dispositivos legais limitam-se à quantificação de coliformes termotolerantes e/ou ovos de helmintos, e não abordam agentes potenciais de disseminação de resistência antimicrobiana como concentrações residuais de antibióticos, BRAs ou GRAs (Tabela 1).

Haja vista que a aplicação de efluente da suinocultura do solo é recorrente e que o uso de antibióticos na suinocultura é uma prática comum, a análise de antibióticos residuais, GRAs e BRAs em efluentes tratados e solos fertirrigados poderia ser uma ferramenta para verificação de potenciais riscos para a saúde, já que a resistência antimicrobiana se tornou uma das maiores preocupações no ramo da saúde (WHO, 2018).

Tabela 1- Legislações sobre reuso de água no Brasil

Legislações	Órgão	Matéria	Parâmetros exigidos/condições de aplicação
Resolução nº 54/2005	CNRH	Modalidades, diretrizes e critérios gerais para a prática de reuso direto não potável de água, e dá outras providências.	O reuso direto não potável de água, abrange a aplicação para produção agrícola e cultivo de florestas plantadas.
Resolução nº 121/2010	CNRH	Diretrizes e critérios para a prática de reuso direto não potável de água na modalidade agrícola e florestal	A aplicação de água de reuso para fins agrícolas e florestais não pode apresentar riscos ou causar danos ambientais e a saúde pública.
Resolução nº 430/2011	CONAMA	Condições e padrões de lançamento de efluentes	A disposição de efluentes no solo não pode causar poluição ou contaminação das águas superficiais e subterrâneas
Deliberação Normativa Conjunta nº 01/2008	COPAM e CERH- MG	Classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais enquadrando, condições e padrões de lançamento de efluentes.	Limite de 200 coliformes termotolerantes por 100 mililitros em 80% ou mais, de pelo menos 6 (seis) amostras, coletadas durante o período de um ano, com frequência bimestral
Resolução 498/2020	CONAMA	Critérios e procedimentos para produção e aplicação de biossólidos em solos, e dá outras providências.	Caracterização do biossólidos a ser destinado para uso, em solos, deve prever potencial agrônomo, redução de atratividade de vetores; substâncias químicas; e qualidade microbiológica.
Resolução nº 75/2010	CONERH /BAHIA	Procedimentos para disciplinar a prática de reuso direto não potável de água na modalidade agrícola e/ou florestal.	Coliformes termotolerantes por 100 ml: até 1x10 ⁵ (média geométrica durante o período de irrigação, alternativa e preferencialmente pode-se determinar E. coli). Ovos de helmintos por litro :1 unidade
Resolução conjunta nº 01/2020	ESTADO DE SÃO PAULO	Reuso direto não potável de água, para fins urbanos, proveniente de Estações de Tratamento de Esgoto Sanitário e dá providências correlatas.	Coliformes termotolerantes: ≤ 200 ou E. coli ≤ 120 UFC/100mL Ovos de helmintos: até 1 ovo/L ou ovos viáveis de <i>Ascaris sp</i> : até 0,1 ovos/L Giárdia e <i>Cryptosporidium</i> : não detectável (cistos/L)
Lei nº 16.033/2016	ESTADO DO CEARÁ	Política de reuso de água não potável no âmbito do Estado do Ceará	Instituição do Selo Reuso para os usuários de água de reuso externo e interno.

Fonte: a autora.

3.3 TRATAMENTO DO EFLUENTE LÍQUIDO DA SUINOCULTURA

A definição do líquido já tratado proveniente da limpeza das áreas de produção animal detém de variadas terminologias como dejetos, fração líquida, líquido clarificado, águas residuárias, efluentes de currais leiteiros, efluente, sobrenadante (SALAZAR *et al*, 2019). O termo utilizado nessa pesquisa será “efluente tratado”.

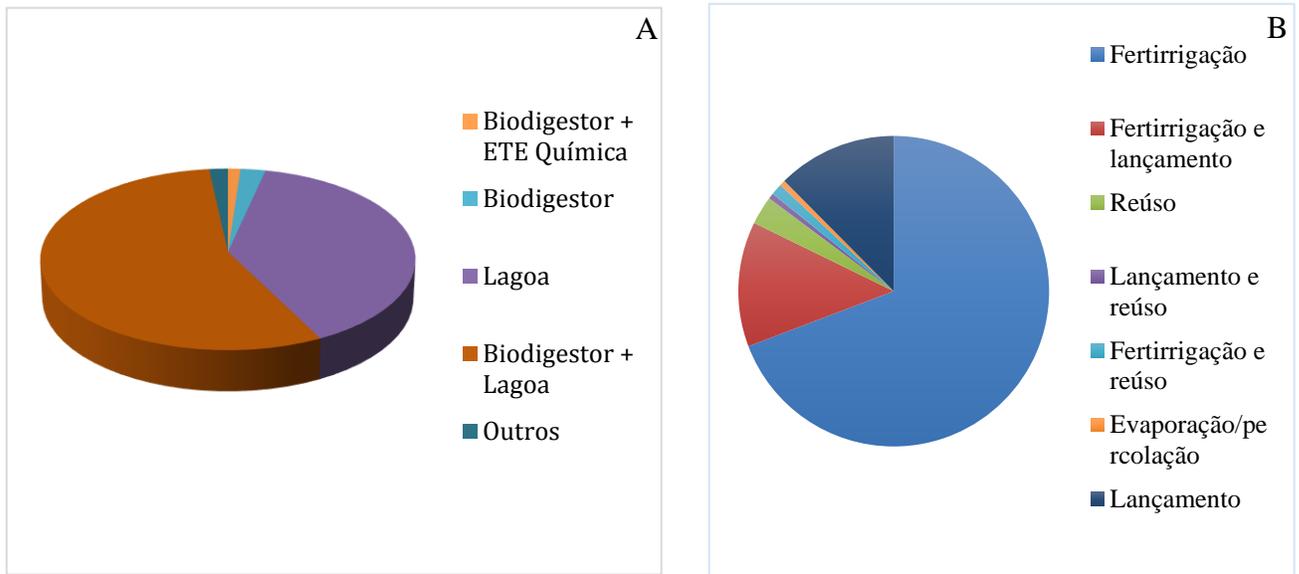
Na suinocultura, o efluente líquido geralmente é composto por fezes, urina, pelos, carcaças- quando a atividade possui um sistema de abatedouro-, excedentes de rações entre outros materiais advindos dos processos produtivos (OLIVEIRA, 2021). Apesar da grande variação de parâmetros entre as granjas de suinocultura, quando os efluentes dessa atividade são analisados, comumente são encontradas concentrações altas de matéria orgânica e sólidos em suspensão, além de quantidades significativas de nitrogênio e fósforo (BRITO *et al.*, 2017).

Para uma destinação correta do efluente tratado, faz-se necessário o conhecimento prévio da carga orgânica e inorgânica através de análises de suas propriedades físicas, químicas e biológicas a fim de dispor de tratamentos apropriados e proteger o meio de possíveis contaminações. A tecnologia empregada deve propiciar a minimização de perturbações para o meio e se possível, o reaproveitamento dos resíduos.

Não há consenso na literatura quanto à melhor técnica para manejo de dejetos suínos no Brasil, devido às peculiaridades de cada sistema de criação de suínos. As técnicas compreendem desde as mais simples como esterqueiras, bioesterqueiras, biodigestores aos sistemas de lagoas em série, compostagem entre outras. O tratamento de dejetos somente deve ser realizado quando os elementos fertilizantes excederem às necessidades nutricionais das culturas e causarem alguma situação de risco de contaminação ou poluição (OLIVEIRA, 2021).

No Estado de Minas Gerais, o sistema de biodigestor seguido de lagoa(s) prevalece com supremacia nos tratamentos de efluentes (96 empreendimentos) nas suinoculturas ciclo completo (Figura 1-A), presentes no (SIAM-MG)- Sistema de Informações Ambientais do Estado de Minas Gerais (BRITO *et al.*, 2017). Como disposição final dos efluentes, a fertirrigação representa o maior uso, com cerca de 117 empreendimentos que utilizam a técnica, seguida de fertirrigação e lançamento em corpos hídricos (Figura 1-B).

Figura 1- Tratamentos dos efluentes da suinocultura em Minas Gerais e disposição final dos efluentes da suinocultura em Minas Gerais



Fonte: Adaptado de Brito (2017). A: Tratamento dos efluentes e B: Disposição final dos efluentes

O sistema de lagoas é o mais recomendado pela OMS na irrigação de alimentos crus e industrializados. Uma alternativa seria a interação entre os dois mecanismos biológicos, utilizando o biodigestor anaeróbico, e em seguida um tipo de lagoa de estabilização, que podem ser aeróbias, anaeróbias e facultativas (OLIVEIRA, 2021). O sistema de tratamento elaborado pela EMBRAPA/UFSC, composto por um decantador seguido de quatro lagoas - duas lagoas anaeróbias, uma lagoa facultativa e uma lagoa com aguapés compõe uma das soluções para adequação dos dejetos suínos às legislações ambientais. (KUNZ *et al*, 2005)

3.4 ANTIBIÓTICOS E SUINOCULTURA

Na medicina veterinária é comum o uso de antibióticos como recurso terapêutico, na prevenção de patologias e indução do crescimento dos animais. Como promotores de crescimento, os antimicrobianos auxiliam na manutenção da qualidade da microbiota intestinal, melhorando a absorção de nutrientes. Como atuam diretamente no controle da microbiota patogênica, reduzem a competição por nutrientes e de metabólicos que dificultariam o crescimento animal (DUARTE, 2021).

Dessa forma, os antimicrobianos são importantes sobretudo em sistemas de confinamento, atuando na prevenção do alastramento de doenças infecciosas entre os animais e de zoonoses aos humanos, na segurança alimentar de mercadorias de procedência animal, assim como na melhoria da produtividade da granja (ARIAS e CARRILHO, 2012).

Contudo, o uso contínuo desses medicamentos reduziu gradativamente os efeitos dos antibióticos empregados, levando ao aumento das dosagens e dependência integral desses medicamentos para manutenção das cadeias produtivas (DUARTE, 2021).

O relatório publicado pela Administração de Alimentos e Medicamentos norte-americana sobre antibióticos vendidos para uso em animais produtores de alimento de 2018 a 2019, realçou a classe das tetraciclina como a mais vendida (cerca de 67% das vendas no mercado interno dos Estados Unidos da América). Dentre a lista, estão a classe das fluoroquinolonas, macrolídeos, sulfonamidas, tetraciclina, penicilinas e polimixinas. Cerca de 85% das lincosamidas e 40% dos macrolídeos comercializados eram para uso em suínos (FDA, 2019; SILVA, 2021).

Um estudo realizado no Brasil com 58 (cinquenta e oito) propriedades de criação de suínos, na região de Tubarão, no Estado de Santa Catarina apontou as aminopenicilinas, tetraciclina, anfencóis, quinolonas e macrolídeos como os grupos de antibióticos mais utilizados nos sistemas de suinocultura visitados, em grande parte de médio porte. Os antibióticos são utilizados na terapia, profilaxia e como promotores de crescimento (ALBERNAZ-GONÇALVES *et al.*, 2021).

No Brasil, alguns fármacos já foram banidos ou pelo menos recomendados a descontinuidade pelo (MAPA) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Tabela 2). A União Europeia, em 1999, banuiu a tilosina, virginiamicina, bacitracina e espiramicina (ANVISA, 2018). A espiramicina foi descontinuada no Brasil treze anos mais tarde pela IN 14/2012. Recentemente, a IN 01/2020 proibiu o uso dos antibióticos tilosina, lincomicina e tiamulina como promotores de crescimento.

Tabela 2- Instruções normativas vigentes do Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento para uso de antimicrobianos em animais

Princípio ativo	Legislação	Recomendação
Avorpacina	Ofício Circular DFPA nº 047/1998	Proíbe uso na alimentação animal com a finalidade de aditivo
Cloranfenicol e nitrofuranos	IN 09/2003	Proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso
Olaquinox	IN 11/2004	Proíbe a fabricação, a importação, a comercialização e o uso como aditivo promotor de crescimento em animais produtores de alimentos.
Carbadox	IN 35/2005	Proíbe a fabricação, a importação, a comercialização e o uso
Anfenicóis, tetraciclina, beta lactâmicos (benzilpenicilâmicos e cefalosporinas), quinolonas e sulfonamidas	IN 26/2009	Vedada a sua utilização como aditivos zootécnicos melhoradores de desempenho ou como conservantes de alimentos para animais.
Eritromicina e espiramicina	IN 14/2012	Descontinuidade. Todavia, podendo ser utilizadas em uso terapêutico
Sulfato de colistina	IN 45/2016	Proíbe a importação e a fabricação da substância a finalidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal,
Tilosina, lincomicina e tiamulina	IN 01/2020	Proibido uso como aditivo

Fonte: ANVISA, 2018; MAPA (2021);.Ministério Público Federal (2013).

Devido à preocupação quanto à resistência antimicrobiana, o MAPA implementou no ano de 2021, o Programa de Vigilância e Monitoramento da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Agropecuária, visando fortalecer conhecimentos científicos e desenvolver um sistema de monitoramento nacional pautando a resistência aos antimicrobianos na agropecuária (MAPA, 2021). Além disso, o MAPA citou, em um manual de orientações sobre aditivos zootécnicos, a necessidade da apresentação de estudos que contemplem os riscos associados à seleção e/ou

transferência de resistência a antibióticos para autorização de matéria prima destinada à fabricação de aditivos zootécnicos (MAPA, 2020).

3.5 ANTIBIÓTICO NORFLOXACINA E BACTÉRIAS RESISTENTES

A norflaxacina é muito utilizada na suinocultura para fins terapêuticos e foi relatada como o antibiótico mais abundante no efluente tratado na granja de suínos do presente estudo (Pereira, não publicado). É um antimicrobiano pouco absorvido pelo intestino: cerca de 2/3 do medicamento é eliminado pelas excretas dos animais), sendo utilizado para tratamento no trato urinário e gastrointestinal (BIBLIOMED, 2021; MORES *et al.*, 2015).

Com composição química ácido metil-7-(1-piperazinil) -6-fluoro-1-4-diidro-4-oxo-3-quinoleína carboxílico, a norflaxacina pertence à classe das fluoroquinolonas e enquadra-se no grupo dos medicamentos mais antigos dessa classe (ciprofloxacina, norfloxacina e ofloxacina). Atua diretamente na inibição das atividades do DNA girase e da topoisomerase, enzimas fundamentais para a replicação das células bacterianas (MANUAL MSD, 2021; REIS, 2014).

Entre as bactérias consideradas como importantes em nível global pela OMS em 2017, estão as resistentes à classe das fluoronoquinolonas, como a *Campylobacter*, e a *Salmonella spp*, além da *Neisseria gonorrhoeae* também resistente a cefalosporina de terceira geração (avaliadas como prioridade alta), e a *Shigella spp* (prioridade média). As bactérias patógenas *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae* são as de maior prioridade (crítica) e todas são resistentes aos carbapenêmicos, antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos (WHO, 2017).

3.6 MECANISMOS BIOQUÍMICOS DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

A resistência a antimicrobianos reflete na capacidade de uma bactéria impedir a ação de um fármaco, relacionada aos genes que codificam variados mecanismos bioquímicos. A resistência a antibióticos pode ser intrínseca, ou seja, já presente de forma natural no código genético do microrganismo ou adquirida, através da transferência de genes e/ou mutações (TAVARES, 2014).

Na resistência adquirida, ocorre alteração na estrutura e bioquímica da bactéria, levando à perda ou ineficiência da ação do medicamento (CHEN *et al.*, 2011). Essas modificações ocorrem por alterações genéticas nos cromossomos ou por plasmídeos, pequenas moléculas de DNA extracromossômicas. Em condições apropriadas, esses fragmentos de DNA podem ser transferidos

para bactérias transformantes, capazes de obter o DNA exógeno. De modo geral, os plasmídeos possuem função de sobrevivência, e muitos contêm genes que codificam a resistência a antimicrobianos (CECCATO *et al*, 2015).

Por se tratar de mecanismos que retratam a diminuição da concentração de antibióticos no meio celular, optou-se por seguir a classificação utilizada por Santos *et al* (2014) e Chen, Chopra *et al* (2011), que associaram a permeabilidade, efluxo e alteração do sistema de transporte em um único agrupamento (redução da concentração do fármaco ou prevenção de seu acúmulo). Dessa forma, os principais mecanismos de defesa citados no presente trabalho são divididos em três grupos, de acordo com as características de inativação do antibiótico. Esses são:

1 – Inativação dos antibióticos por enzimas ou alteração estrutural;

2 –Redução da concentração do fármaco ou prevenção de seu acúmulo, que pode ocorrer pela alteração dos sistemas de transporte da célula ou alteração de permeabilidade, diminuindo o influxo e pela remoção ativa da droga do meio intracelular – efluxo.

3- Alteração do receptor da droga, inativando sua ação sobre o microrganismo ou supressão do receptor a partir da síntese de vias metabólicas (SANTOS, 2014; CHEN *et al*, 2011; YONEYAMA e KATSUMATA, 2006). Na sequência são citados os genes investigados no presente estudo e os mecanismos de resistência que cada gene codifica.

3.6.1 Gene *ermB*

O gene *ermB* configura resistência aos macrolídeos, sendo os principais mecanismos de resistência a modificação do sítio alvo após metilação do ribossomo, sistema de efluxo e inativação pelas enzimas acetiltransferase, hidrolase, nucleotidiltransferase e fosfotransferase (SARIBAS *et al*, 2006; SUI *et al.*, 2016).

Macrolídeos são antibióticos produzidos por diversos microrganismos, todavia, atualmente são modificados por alteração química para produção industrial (MINETTO, 2013). São potentes para ampla diversidade de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Os genes *ermB* são disseminados principalmente em estreptococos e enterococos (LECLERCQ *et al.*, 2002) e sua classe já foi detectada em diversos ambientes agrícolas em solos que receberam efluente tratado (LUBY, MOORMAN e SOUPIR,2016; NEGREANU *et al*, 2012; SONI *et al.*,2015).

3.6.2 Gene *sul*

Sulfonamidas são antibióticos sintéticos que atuam na inibição do ácido fólico, e foram os primeiros antibióticos utilizados frente as infecções bacterianas. Seu uso é uma prática comum na suinocultura, sendo indicado no tratamento de pneumonia bacteriana, colibacilose suína, enterite bacteriana, entre outros. A resistência antimicrobiana de um tipo de sulfonamida também indica resistência aos outros da classe, o que pode facilitar a sua detecção (HOFF *et al.*, 2008; LOFFLIN *et al.*, 2005; WERTH, 2020).

Os mecanismos de resistência bacteriana às sulfonamidas são modificações em estruturas de enzimas que fazem parte do metabolismo do ácido tetraidrofólico ou através da produção de ácido fólico por uma via metabólica alternativa e através da codificação de enzimas diidroprerato sintase com alterações, que reduzem a afinidade com as sulfonamidas, sendo o *sulI* um dos genes codificadores dessas enzimas, além da alteração da permeabilidade da membrana, além de mutações que ocasionam alta síntese de ácido paraminobenzóico (MEZEI, 2017).

4.6.3 Gene *tet*

O grupo das tetracilinas compreende antimicrobianos naturais ou semi-sintéticos (ROSSI, 2017). Constantemente relacionado à multirresistência bacteriana, o gene *tet* configura resistência à tetraciclina e com frequência são associados a elementos móveis como plasmídeos, transposons e integrons, o que configura a disseminação desse gene em diversas espécies de bactérias. Os principais mecanismos de resistência são a bomba de efluxo que reduz a concentração do antibiótico através da redução da concentração da tetraciclina para o meio extracelular através de proteínas de membrana que realizam o transporte ativo e modificação química da droga, em que a tetraciclina se torna inativa perante sua ação de inibidora da síntese de proteínas. (MATINI, 2015; SCHWARZ *et al.*, 1998; VRIES *et al.*, 2009).

A tetraciclina atua ligando-se à subunidade 30S ribossomal da bactéria durante o início da síntese de proteínas, evitando a junção do aminoacil-tRNA ao ribossomo. São considerados antibióticos de amplo espectro e utilização, contudo, houve um notório aumento da resistência bacteriana após sua introdução no uso veterinário e na agricultura (MARTI *et al.*, 2006) O gene *tetA* corresponde à uma bomba de efluxo encontrada em muitas espécies de bactérias gram-negativas (ALDEMA *et al.*, 1996; CARD, 2021).

3.6.4 Gene *blaTEM*

A destruição das enzimas de beta-lactâmicos, por enzimas beta-lactamase, consiste na principal causa da resistência a esses antimicrobianos. Os antibióticos beta-lactâmicos têm um elemento comum em sua estrutura molecular: um anel de quatro átomos conhecido como beta-lactama. A enzima lactamase quebra esse anel, desativando as propriedades antibacterianas da molécula, que configura o mecanismo de resistência do gene *blaTEM* (ANDRADE, 2020).

As beta-lactamases são enzimas produzidas por algumas bactérias e são responsáveis por sua resistência a antibióticos beta-lactâmicos como penicilinas, cefalosporinas (são relativamente resistentes a beta-lactamases), cefalexinas e carbapenêmicos (ertapenem). A diminuição da permeabilidade e alterações estruturais de proteínas ligadoras são também mecanismos de resistências relacionados ao *blaTEM* (TAO *et al.*, 2014). Os antibióticos beta-lactâmicos são normalmente usados para tratar amplo espectro de bactérias gram-positivas e gram-negativas. As beta-lactamases produzidas por organismos gram-negativos são geralmente secretadas (CARD, 2021).

As beta-lactamases são adquiridas por estafilococos por mutação genética ou por transferência de plasmídeos e causam a destruição irreversível da atividade antimicrobiana dos beta-lactâmicos, através da hidrolização da ligação amida do anel beta-lactâmico (TAVARES, 2014).

3.6.5 Gene *qnrB*

Pelo amplo espectro de ação, as fluoroquinolonas estão entre os antibióticos mais prescritos atualmente e são utilizados para tratar diversas infecções humanas (ALDRED *et al.*, 2014). As fluoroquinolonas atuam diretamente na inibição das enzimas (DNA) Ácido Desoxirribonucléico - girase e topoisomerase, importantes para replicação do DNA das bactérias (WERTH, 2020). São antibióticos sintéticos com aplicação na medicina humana e animal e compoem uma das classes de antibióticos mais utilizadas na atualidade no tratamento de infecções de origem bacteriana (DA SILVA *et al.*, 2020).

O principal mecanismo de resistência associado ao gene *qnrB* é a proteção através de proteínas Qnr diante enzimas alvo (CARVALHAIS, 2015). O gene *qnrB* foi o gene mais encontrado em isolados da bactéria *Klebsiella pneumoniae*, em três hospitais em Recife/PE, com perfil de susceptibilidade de resistência a norfloxacin 94,3% (n=28), e está entre as bactérias gram-

negativas mais vinculadas às infecções junto à assistência à saúde no Brasil (SCAVUZZI, 2015; BIEDENBACH *et al.*, 2004).

3.6.6 Elemento móvel integrase

Integrans são elementos genéticos que possuem capacidade de transferência entre espécies e linhagens, com acesso a um amplo conjunto de genes, permitindo a expressão e captura de genes exógenos. O *int1* refere-se ao gene que codifica uma integron integrase, constantemente relacionados à GRAs. Pode ser encontrado tanto em bactérias patogênicas e não patogênicas, com rápida mobilidade, a depender do tempo de geração da célula hospedeira (GILLINGS, 2014).

3.7 GENES DE RESISTÊNCIA EM AMOSTRAS AMBIENTAIS

Acredita-se que a propagação de genes de resistência a antibióticos deve-se a uma seleção natural promovida entre o contato de bactérias a componentes antibióticos. Quando um antibiótico administrado alcança o sistema gastrointestinal dos animais, ocorre pressão seletiva entre os microrganismos presentes no meio, onde bactérias sobreviventes, ao multiplicar-se, pluralizam também genes de resistência. Parte da droga e das bactérias é eliminada junto aos estrumes produzidos pelos animais (NEGREANU *et al.*, 2012).

De acordo com Pereira *et al* (2021), mais de 240 tipos de GRAs já foram detectados em amostras de estrumes e grande parte correlacionada com antibióticos utilizados na produção animal. Assim, estudos indicaram principalmente o compartilhamento de GRAs relacionados às classes dos antibióticos sulfonamidas (*sul3*), tetraciclinas (*tetC*, *tetO*, *tetX*, *tetW*, *tetM*, *tetL*, *tetG*) e eritromicinas (*ermB* e *ermC*) em amostras de estrumes animais da suinocultura, bovinocultura e avicultura (PEREIRA *et al*, 2021).

Em sistemas de suinocultura, usualmente, aplica-se o efluente pós-tratamento diretamente no solo. A biomassa microbiana até então presente no efluente é em grande parte eliminada ao entrar em contato com o solo, por alterações físicas e químicas do novo meio, como a mudança de temperatura e a incidência dos raios solares, afetando assim o equilíbrio da microbiota (ARAÚJO, 2002). Como a informação genética da bactéria resistente permanece mesmo após sua morte, os genes de resistência podem ser transferidos a outros microrganismos presentes em solos e nos cursos hídricos, levando à contaminação desses ambientes.

Já foi observada a ocorrência dos antibióticos da classe das sulfonamidas e tetraciclinas na maior parte de amostras de dejetos suínos na China, com concentração máxima de até 57,95 mg

(CHEN *et al.*, 2017). Loof *et al.* (2021), observaram ainda um aumento de GRAs no interior intestinal de suínos alimentados com ração adicionada de antibióticos. Na Tabela 3 são apresentados os principais estudos encontrados na literatura sobre a detecção de genes de resistência no solo após a aplicação de efluente residuário e de alguns estudos envolvendo ambientes aquáticos.

Estudos a respeito do efeito da aplicação de efluente tratado na perspectiva da resistência a antibióticos ainda são escassos na literatura, sendo mais comuns os referentes a solos irrigados com efluente bruto ou com aplicação de estrume de animais, em que parte apresentam maior abundância de GRAs após esse tipo de tratamento no solo, comparado a solos controle (HAN *et al.*, 2016; PENG, S *et al.*, 2015; HEUER *et al.*, 2011).

Alguns estudos não observaram aumento significativo da abundância relativa de GRAs como sulfonamidas, tetraciclinas e eritromicinas em solos que receberam efluente tratado, mesmo em experimentos à longo prazo, 6 a 18 anos (NEGREANU *et al.*, 2012; BEN *et al.*, 2017). Entretanto outros, mais recentes, apontaram aumento de GRAs às sulfonamidas, fluoroquinolonas, beta-lactâmicos, tetraciclinas e o elemento genético móvel integrase I (KAMPOURIS *et al.*, 2021).

Agersø & Sandvang (2005), investigaram a resistência à tetraciclina em *Alcaligenes*, *Arthbacter* e *Pseudomonas* presentes em efluentes da suinocultura, e atestaram o risco da fertirrigação na possibilidade de transferência de GRAs do solo para animais e humanos por meio de culturas vegetais ou água potável. A ingestão de alimentos contaminados poderia disseminar a resistência antimicrobiana aumentando gradativamente a diversidade em comunidades bacterianas resistentes.

Em um estudo similar, Binh *et al.*, (2008) encontraram um reservatório de plasmídeos de ampla gama de hospedeiros que alojam múltiplos GRAs em amostras de solos fertirrigados com efluente da suinocultura. Indicaram ainda a possibilidade da transferência de GRAs através da alimentação humana, por meio de vegetais crus ou pela alimentação dos animais. Em um estudo realizado em Minas Gerais, todas amostras de fezes de isolados de suínos de *Escherichia coli*(patogênicos e não patogênicos), foram resistentes aos antimicrobianos ampicilina, tiamulina, tetraciclina e ácido nalidíxico e multirresistentes – quando são resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos. A bactéria é responsável por uma ampla gama de sintomas em humanos.

Tabela 3- Abundância de GRAs reportadas na literatura em amostras ambientais

Amostras	País	Gene de resistência	Abundância absoluta	Abundância relativa (<i>rRNA 16s</i>)	Conclusão	Referência
Solo alterado com estrume suíno Solo sem aplicação de estrume	Alemanha	Sul (1) e sul(2)	-	-4 a 3 log ₁₀ de cópias de gene -5 a -4 log ₁₀ de cópias de gene Obs: Sul (2) não detectado em solo sem histórico de aplicação de estrume	O acúmulo de genes de resistência no solo devido à disseminação constante de estrume está provavelmente ameaçando a terapia de doenças infecciosas	Heuer <i>et al.</i> , 2011
Solo irrigado com efluente tratado e irrigados com água fresca	Israel	sul(1), sul(2), tet(O), erm(f), erm(B), qnr(a)	4 a 6 log ₁₀ (cópia por grama/mL) 3 a 6 log ₁₀	-5 a -2 log ₁₀ -5 a -2 log ₁₀ de cópias de gene Obs: Qnr abaixo dos limites de detecção em todas as amostras	Em geral, não houve aumento significativo de GRAS. Bactérias do efluente não são capazes de competir com as bactérias do solo, mesmo ao longo do tempo. Não encontraram correlação entre o efluente e o aumento de GR	Negreanu <i>et al.</i> , 2012
Solos de parques irrigados com água recuperada e sem água recuperada	China	Tet (G), tet(W), sul(1), sul(2) e int(1)	Solo sem água recuperada: 5 a 8 log ₁₀ de cópias -	-4 a -2 log ₁₀ -6 a -3 log ₁₀ de cópias de gene por rRNA 16S	Comparando estudos com solo em que aplicaram estrume da suinocultura, a concentração de antibióticos nos solos de parques irrigados com água residuária foi bem menor. Mas baixas taxas de antibióticos também pode induzir ARGs e estimular transferência horizontal de GRAs	Wang <i>et al.</i> , 2014

Tabela 3- Abundância de GRAs reportadas na literatura em amostras ambientais (continuação)

Amostras	País	Gene de resistência	Abundância absoluta	Abundância relativa (<i>rRNA 16s</i>)	Conclusão	Referência
Solo de suinocultura fertilizado com estrume tratado e não fertilizado	China	Tet(w),tet(B), tet(O), tet(s), tet(C), tet(G), tet(Z), tet(L) e tet(X)	-	-1 a -2 log ₁₀ de cópias de tet/16S rRNA	A abundância de <i>tetG</i> , <i>tetL</i> e <i>tetB</i> aumentaram após fertilização com estrume.	Peng, S <i>et al</i> , 2015
Solo de parques irrigados com efluente e com água fresca	Austrália	<i>Int1, tnpA, Bet a-lactâmicos A, B, C e D</i>	-	Não citou abundância de GRAs	Número de ARGs detectados no solo com reuso de água foi significativamente maior do que os que não receberam esse tipo de tratamento. Não houve diferença significativa entre os solos que receberam água potável e os solos “primitivos”.	Han <i>et al.</i> , 2016
Solos fertilizados com estrume suíno e não fertilizado	China	<i>Tet (C), tet(O) e tet(W),</i>	-	-4 a -1 log de cópias de gene -5 a -2 log de cópias de genes	O impacto da irrigação com efluente tratado depende principalmente da carga de GRA e da intensidade da irrigação	Ben <i>et al.</i> , 2017
Solo irrigado irrigado com efluente comercial tratado e solo não irrigado.	Alemanha	<i>Int(1), tet(M), blaTEM, sul1, blaOXA-58, qnr(S), blaCTX-M32</i>	-	-8 a -3 log ₁₀ cópias -6 a 3 log ₁₀ cópias	Água residuária tratada promove disseminação de GRAs e <i>int1</i> no solo em comparação com irrigação com água fresca. O impacto da água residuária tratada depende da carga de GRAs e da intensidade da irrigação.	Kampouris <i>et al.</i> , 2021

Tabela 3- Abundância de GRAs reportadas na literatura em amostras ambientais (continuação)

Amostras	País	Gene de resistência	Abundância absoluta	Abundância relativa (<i>rRNA 16s</i>)	Conclusão	Referência
Rio urbano (curso de água poluído)	Brasil	<i>sul I</i> , <i>blaTEM</i> , <i>ermB</i> e <i>qnrS</i>	0 a 3 log ₁₀ 2 a 6 log ₁₀ 0 a 2 log ₁₀ -1 a 3 log ₁₀	-	Distribuição temporal e espacial do gene dependeu da estação, presença de GRAs a sulfonamidas, eritromicina e quinolona, com maior concentração do gene <i>blaTEM</i>	Arsand, <i>et al.</i> , 2020
Água de lagos	Suíça	<i>Sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetB</i> , <i>tetM</i> e <i>tetW</i>	-	-5 a -1 log ₁₀	A abundância de genes <i>sul1</i> , mesmo a resistência natural de lagos de água doce pode ser afetada por atividades antropogênicas, como descarga de águas residuais.	Czekalski <i>et al.</i> , 2015
Amostras água residuária de planta de estação de tratamento, indústria farmacêutica, de hospital, sedimento de um lago urbano e de estrume suíno	China	<i>Int1</i> , <i>sul1</i> , <i>tetW</i> , <i>tetX</i> , <i>blaTEM</i> , <i>ampC</i> , <i>cat</i> , <i>cmr</i> , <i>erma</i> e <i>ermB</i>		-6 a 0 log ₁₀	As amostras de hospital foram as mais abundantes em GRAs, e a abundância de GRA extracelulares foi maior do que intracelulares dessa amostra.	Dong <i>et al.</i> , 2019

Fonte: a autora.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDO

A área de estudo corresponde a uma área adjacente à uma granja de suinocultura situada no interior de Minas Gerais, Brasil, que fornece o seu efluente tratado para fertirrigação. O empreendimento conta com aproximadamente 450 matrizes (porcas em lactação). Há cinco galpões que abrigam os animais, com limpeza das baias executadas semanalmente em que os dejetos são drenados para o sistema de tratamento do local. O tratamento do efluente (Tabela 4) gerado na limpeza da área de confinamento é composto por um biodigestor e três lagoas facultativas impermeáveis, com tempo de retenção de 120 dias (Figura 2).

Figura 2- Sistema de tratamento de efluentes da suinocultura estudada



Fonte: a autora.

Após esse período, o efluente tratado é destinado a áreas de pastagem e lavoura no próprio empreendimento, com vazão de 50 m³ por dia. As lagoas facultativas que integram o sistema de tratamento de efluentes do empreendimento localizam-se na parte alta da propriedade, para o qual, no primeiro momento, o efluente é direcionado para o biodigestor e posteriormente para as lagoas através de bombeamento.

Tabela 4- Definição e funcionamento de biodigestor e lagoa facultativa

Unidades de tratamento	Conceito	Funcionamento	Referência
Biodigestor	Equipamento fechado em que ocorre a decomposição da matéria orgânica.	Digestão anaeróbia é realizada por meio de bactérias anaeróbias, produzindo a biogás - como metano e dióxido de carbono. O biogás pode ser utilizado como fonte de energia elétrica.	(DIESEL, 2002).
Lagoa Facultativa	Sistema de tratamento secundário no qual prevalece a remoção de matéria orgânica. Profundidade de 1,5 a 2 metros, propicia a existência de duas zonas de degradação: anaeróbia e aeróbia	Parte da matéria orgânica (DBO particulada) sedimenta após alguns dias na lagoa, formando lodo na seção inferior, a que sofre degradação por bactérias anaeróbias, convertendo-se assim entre outros compostos, em gás carbônico e metano. A DBO particulada dispersa no efluente é então digerida por bactérias facultativas, que utilizam ora matéria orgânica como fonte de energia através da respiração ora o oxigênio.	(VON SPERLING, 2014, MARCHI, 2010).

Fonte: a autora.

O efluente líquido tratado é encaminhado, por gravidade, através de tubulações, para uma área de pastagem de aproximadamente 4,8 hectares para cultivo de milho (Figura 3). As concentrações de carbono orgânico total e nitrogênio total do efluente tratado são mostradas na Tabela 5. O efluente é então disposto no solo através de aspersores do tipo canhão. Segundo o proprietário, a área estudada recebe o efluente suíno em tratamento há 10 anos.

A área do solo não fertirrigado localiza-se próxima a entrada do empreendimento, fração inferior do terreno, em contraste com a área que recebe o efluente tratado que se localiza na porção superior do terreno, conforme Figura 3. Há na propriedade um açude abaixo da área não

fertirrigada diretamente, distante cerca de 290 metros da área de fertirrigação. Na área inferior ao açude há um córrego afluente do Córrego do Falhado, que deságua no rio Piranga.

Figura 3- Área de estudo da suinocultura estudada



Fonte: a autora. O polígono verde compreende a área fertirrigada diretamente com o efluente tratado e o polígono amarelo, a área fertirrigada amostrada neste estudo. O polígono azul parte inferior da figura representa área do solo não fertirrigado amostrada.

4.2 AMOSTRAGEM DO SOLO E DE ÁGUA SUPERFICIAL

Foram realizadas quatro campanhas amostrais (Tabela 5) de solo na área fertirrigada (solo 1, código S1) e da mesma forma, foi selecionada uma área à jusante, sem histórico de descarga direta de efluentes -denominado solo 2 (código S2). O solo do estudo é caracterizado como latossolo vermelho amarelo distrófico, que compreende um solo de baixa fertilidade, baixo teor de fósforo e baixa quantidade de água disponível às plantas (ALMEIDA *et al*, 2021).

Em cada campanha amostral foram coletadas aproximadamente 250 g de solo, ao longo de 10 cm de profundidade, em cinco pontos aleatórios nas áreas de estudo, conforme descrito em documento da EMBRAPA (2006). Em paralelo com as coletas de solo, foram coletadas amostras do efluente tratado da saída da tubulação de irrigação que é direcionado à plantação de milho

(código E, volume 1L) e de água do açude, compreendendo uma amostra composta, localizado à jusante da irrigação (código A, volume 2L) . As amostras foram conservadas a uma temperatura de -20° C para análises biomoleculares e a 4°C para análises físico-químicas.

Tabela 5- Amostragem de efluente tratado, água do açude e do solo em uma suinocultura em Minas Gerais

Amostragem	Amostras coletados	Características da coleta da área fertirrigada	Condição climática	Data da coleta
C1	S1, S2 e E	Plantas em desenvolvimento	Tempo nublado	20/01/2020
C2	S1, S2, E, A	Solo arado, sem plantas	Tempo ensolarado	16/08/2020
C3	S1, S2, E, A	Solo arado, sem plantas	Tempo ensolarado	15/03/2021
C4	S1, S2, E, A	Plantas em desenvolvimento	Tempo ensolarado	12/04/2021

Fonte: a autora. Coleta 1 (C1), Coleta 2 (C2), Coleta 3 (C3) e Coleta 4 (C4), solo fertirrigado (S1), solo à jusante (S2), açude (A), efluente tratado (E).

4.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS DE SOLO E EFLUENTE TRATADO

O pH em água do solo foi mensurado de acordo com recomendações da Embrapa (1997). Para análise de (COT) Carbono Orgânico Total do solo, a umidade das amostras de solo foi removida através do Analisador de Umidade Ohaus MB25 e o COT foi determinado pelo equipamento Analisador de Carbono Orgânico Total, em inglês *Total Organic Carbon Analyser – TOC-LCPH/CPN* (Shimadzu®). Para a análise de Nitrogênio Total das amostras de solo utilizou-se o mesmo equipamento utilizado para COT, porém foi realizada previamente digestão com ácido acético, segundo metodologia Pontes (2012).

As análises de granulometria do solo foram realizadas no Laboratório de Solos da Fundação Gorceix, Ouro Preto. Utilizou-se aproximadamente 500g de solo e após a secagem em estufa à 105 ° C, as amostras foram quarteadas até aproximadamente 300g e depois passadas em peneira de 2mm. Assim, o material foi lavado em agitador mecânico nas peneiras de nº 16, 30, 60, 100 e 200,

conforme NBR 6457. O material retido em cada peneira foi separado e pesado após seco na estufa à 105°C para cálculos posteriores

A determinação do material fino foi realizada a partir de deslamagem do material, contendo 100g de solo e 4L de água. Para decantação foi adicionado hexametáfosfato de sódio 1%, cerca de 3 gramas para cada 30 ml de água. Após 5 minutos, o material foi agitado com o auxílio de um plunger durante mais 5 minutos. O sobrenadante foi transferido por gravidade (sistema sifão) para um béquer de 4L e completado com água até atingir 4L. O líquido sanfonado e o sólido decantado foram secos e pesados.

A interpretação granulométrica partiu do princípio de que o peso do passante na peneira com malha superior a 5 µm se refere à areia, a fração menor que 5 µm, refere-se à argila e a fração intermediária, ao silte (SAMPAIO *et al* 2007), de acordo com a aproximação das malhas da peneira e a classificação de tamanho de partículas de solo (Tabela 6), adotada pela EMBRAPA (1979).

Tabela 6- Classificação de tamanho de partículas de solo

	Diâmetro (mm)	Micra (µm)
Argila	< 0,002	2
Silte	0,002 - 0,05	2 a 50
Areia Fina	0,05 - 0,2	50 a 200
Areia Grossa	0,2 - 2	200 a 2000

Fonte: EMBRAPA, 1979

Para análise de COT e de NT do efluente tratado, foram separados dois microtubos eppendorf de 2 mL e centrifugados na velocidade máxima por 10 minutos. Os sobrenadantes foram vertidos para novos tubos e filtrado em membrana de filtração 0,45 µm 47 mm e diluídos 50 vezes com água mili-q para análise no equipamento TOC do efluente tratado no equipamento TOC-LCPH/CPN (Shimadzu®), conforme instruções internas do laboratório.

4.4 ANÁLISE DOS ELEMENTOS GENÉTICOS DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

Para análise das amostras líquidas (açude e efluente tratado), foram separados seis tubos tipo Falcon de 50 mL e o material foi centrifugado à 4500 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e então foi adicionado 10 mL de solução Tampão de Fosfato Salino – PBS (140 mM

NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 3 mM KCl, pH 7,2). O material foi centrifugado novamente nas mesmas condições, retirado o *pellet* e congelado à -20°C.

Tabela 7- Lista de primers utilizados

Gene	Primer	Sequência	Tem p. (°C)	Amplicon (pb)	Referência
<i>tetA</i>	<i>tetA</i> fw <i>tetA</i> rv	GCTACATCCTGCTTGCCTTC CATAGATCGCCGTGAAGAGG	54,6	210	MAO <i>et al.</i> , 2015
<i>sulI</i>	<i>sulI</i> fw <i>sulI</i> rv	CGCACCGGAAACATCGCTGC AC TGAAGTTCGCGCAAGGCT CG	55,8	163	MAO <i>et al.</i> , 2015
<i>ermB</i>	<i>ermB</i> fw <i>ermB</i> rv	CGTGCGTCTGACATCTATCT GA CTGTGGTATGGCGGGTAAGT T	56,8	190	MAO <i>et al.</i> , 2015
<i>qnrB</i>	<i>qnrB</i> fw <i>qnrB</i> rv	GCGACGTTTCAGTGGTTCAG TGTCCTCCGATCGTTGTCAG AA	54,7	148	MAO <i>et al.</i> , 2015
<i>bla</i> _{TEM} _M	<i>bla</i> _{TEM} fw <i>bla</i> _{TEM} rv	GCACGAGTGGGTTACATCGA GGTCTCCGATCGTTGTCAG	48	311	TAO <i>et al.</i> , 2014
<i>intI</i>	<i>intI</i> fw <i>intI</i> rv	CCTCCCGCACGATGATC TCCACGCATCGTCAGGC	60	280	GOLDSTEIN <i>et al.</i> , 2001
RNA _r 16S	1055 fw 1392 rv	ATGGCTGTCGTCAGCT ACGGGCGGTGTGTAC	53	337	FERRIS; MUYZER; WARD <i>et al.</i> (1996)

Fonte: a autora.

Procedeu-se com a extração de DNA das amostras líquida e dos solos (0,25 g) com o kit DNeasy PowerSoil (QIAGEN®), seguindo o protocolo recomendado. Para as ampliações as amostras de DNA extraídas do efluente tratado e da água do açude foram diluídas à 5 ng µL⁻¹, enquanto as amostras de solo foram utilizadas nas reações sem diluição.

A amplificação e quantificação de GRA (Tabela 7) foram realizadas no Sistema de PCR em Tempo Real 7500 (Applied Biosystems). Foram utilizados iniciadores contendo genes de resistência a beta-lactâmicos, eritromicina, sulfonamidas, tetraciclina e fluoroquinolonas (genes *bla*_{TEM}, *ermB*, *sulI*, *tetA* e *qnrB*, respectivamente), além do elemento genético móvel integrase 1

(*intI*) e do gene do (RNA) Ácido ribonucleico ribossomal 16S, para o domínio *Bacteria*. Para cada reação foi adicionado: 3,8 µL de água ultrapura, 5,0 µL de PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix, 0,1 µL de cada par de primers (30 µM) e 1,0 µL de amostra de DNA. Os controles positivos (*intI*, *qnrB*, *sull*, *tetA*, *ermB*, *blaTEM* e *RNAr 16S*) que foram gerados e utilizados para preparar as curvas padrão, foram obtidos pela clonagem de cada amplificador específico de gene em um vetor plasmidial (kit pGem Easy Vector, Promega), seguido de transformação em *Escherichia coli* JM109 competente, gentilmente cedidos pela Profa. Dra, Juliana Calabria de Araújo da Universidade Federal de Minas Gerais.

As colônias contendo plasmídeo recombinante foram replicadas em meio Luria Bertani (LB) com concentração de 100 µg mL⁻¹ de ampicilina e então armazenadas em estufa à 37°C por 16h. Uma colônia crescida foi transferida para um tubo de 50 mL que continha 5 mL do meio LB e 100 µg mL⁻¹ de ampicilina e então agitado em *shaker* durante 5h, com rotação 180 rpm. O volume do tubo foi completado com o meio mencionado anteriormente e em seguida foi agitado por mais 16h. Por fim, parte do material foi coletado, preservado no meio glicerol (500 g L⁻¹), e armazenado a -80 °C.

A extração dos plasmídeos foi realizada com o restante do material, conforme instruções do fabricante, com o kit Midiprep (Promega). Em seguida, DNA foi quantificado no equipamento NanoDrop e armazenados a -20 °C para síntese das curvas-padrão para quantificação dos genes na qPCR. Foi utilizada a Equação 1 para quantificar as cópias de DNA por µL dos controles positivos, considerando número de moléculas e massa de 1 mol de pares de base conforme Whelan e Russel, 2003).

Equação 1:

$$\text{n}^\circ \text{ de cópias de DNA } \mu\text{L}^{-1} = \frac{6,02 \times 10^{23} (\text{cópias mol}^{-1}) \times \text{DNA } (\text{g } \mu\text{L}^{-1})}{\text{tamanho do DNA (pb)} \times 649 (\text{g mol}^{-1} \text{ pb}^{-1})}$$

Fonte: a autora. Foi considerado um n° de moléculas um número 6,02 x 10²³ e 649 em 1 mol.

As curvas padrão de cada gene do estudo foram concebidas, contendo seis pontos, com diluição seriada 1:10 dos controles. Para cada curva padrão, a equação foi obtida através do cruzamento do log da concentração de cada ponto (concentração inicial dos controles positivos) e (Ct) Ciclo Threshold para cada um dos pontos.

O Ct corresponde ao momento da reação de qPCR em que a fluorescência refletiva em cada amostra é detectada, em que é possível quantificar o número de cópias de DNA gerado. Foram consideradas curvas ideais quando foi atingido $R^2 > 0,99$, inclinação da reta entre -3,1 e -3,6 e eficiência entre 90 e 110%. Cada análise foi realizada em triplicata para curva e amostras, adicionando-se amostra “branco” na qual não foram adicionadas as amostras.

Para estimar a quantificação de cópias de genes por μL e por grama de cada amostras, substitui-se o Ct nas equações de cada curva padrão, com posterior correção, observando-se o volume, quantificação de DNA estimada e real (após a extração), as massas de solo e pellet e o teor de sólidos das amostras líquidas. Dessa forma, foi obtido a abundância absoluta, representada pela quantidade cópias de genes por mL de amostra líquida ou grama de solo.

Por fim, para adequação à literatura, os resultados foram normalizados, através da razão da abundância absoluta (n° cópias gene mL^{-1} ou g de amostra) de cada gene pela quantificação das bactérias totais (n° cópias RNAr 16S mL^{-1} de amostra ou g de solo), gerando assim a abundância relativa de cada amostra. As condições utilizadas no equipamento para amplificação das amostras são detalhadas na Tabela 8.

Tabela 8: Condições para amplificação das amostras

		Temperatura (°C)	Tempo
Estágio <i>holding</i>	Degrau 1	37	15 min
	Degrau 2	95	10 min
Estágio de ciclos (40 ciclos)	Degrau 1	95	10 s
	Degrau 2	x*	30 s
	Degrau 3	72	30 s
Estágio curva de <i>Melt</i>	Degrau 1	95	15 s
	Degrau 2	60	15 s
	Degrau 3	95	15 s
	Degrau 4	60	15 s

* x= temperatura de anelamento específica para cada

Fonte: a autora.

4.5 ISOLAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES A NORFLOXACINA

Para esta análise foram utilizadas as amostras de solo da campanha amostral 4, com o objetivo de quantificar bactérias heterotróficas totais e bactérias heterotróficas resistentes a norfloxacina, uma vez que o antibiótico norfloxacino também pode ser adsorvido no solo (PERUCHI *et al*, 2015).

A escolha do antibiótico baseou-se no fato de que o antibiótico foi detectado no efluente tratado com valor mediano de 17 µg/L (Andressa Rezende, comunicação pessoal).

Foi utilizado para o isolamento e contagem, o meio de cultivo (PCA) *Plate Count Ágar*, acrescido ou não de 12,5 ml do antibiótico (concentração final de 74 mg/L). Um total de 0,5 g de cada quintuplicata de amostra do solo S1 e S2 foram ressuspensos em 1 mL de água destilada autoclavada. Utilizou-se 100 µl dessa suspensão para realização da diluição seriada até 10^{-3} . De cada diluição, foi inoculada 50 µl nas placas preparadas anteriormente com e sem o antibiótico norfloxacina. Para homogeneização, foram realizadas semeaduras de todas as diluições com pérolas de vidro estéreis pelo método *spread plate*.

Após inoculação, as placas foram incubadas a 27°C por 24 horas e em seguida na estufa de 37°C por 20 horas. Após o período de crescimento, realizou-se a contagem das colônias e aplicou-se os fatores de diluição de cada amostra para a determinação da (UFC) Unidade formadora de Colônias por mL de amostra. Algumas colônias foram submetidas à identificação molecular, por meio do sequenciamento do fragmento DNAr 16S, conduzido pela empresa Genomic Engenharia Molecular.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise estatística foi utilizado o teste Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade dos dados, teste T de Student para dados paramétricos, Mann-Whitney para dados não paramétricos, teste Wilcoxon para comparação dos dados físico-químicos do solo e o coeficiente de correlação de Spearman, além do teste Kruskal para análise estatística da abundância relativa das amostras de solo e efluente tratado. Em adição, foi utilizado o teste de comparação múltipla por meio do software Jamovi, versão 1.8.4 com significância de $p < 0,05$, além do software Microsoft Excel para gráficos. Para análises de PCA- Análises das Componentes principais, foi utilizado o software Past, versão 2.17.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DAS AMOSTRAS DO EFLUENTE TRATADO, SOLOS E ÁGUA DO AÇUDE

A fim de comparar algumas propriedades dos dois solos analisados, S1 solo com constante fertirrigação e S2 solo à jusante sem fertirrigação direta, os parâmetros granulometria (Tabela 10), pH (Figura 9), COT (Figura 10) e Nitrogênio (Figura 11) foram analisados em todas as coletas, assim como o COT e NT efluente tratado (Tabela 9).

5.1.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EFLUENTE TRATADO (ET)

Quanta à caracterização do (ET) efluente tratado, o teor de COT médio (n=4) foi de aproximadamente 713,2 mg/L, os valores por coleta são listados na Tabela 9. Considerando a área de cultivo de 4,8 ha e uma vazão de 50.000 L/dia, é possível estimar uma carga de aproximadamente 6,87 kg de COT /ha.d aplicada em cada irrigação. Quanto ao teor de NT, a média do efluente tratado foi de 2534,5 mg/L (n=2), com carga de nitrogênio aplicada nas mesmas condições de 25,4 kg de NT /ha.d.

A recomendação para adubação nitrogenada é de 40 a 80 kg de nitrogênio por hectare ao longo de todo o cultivo de milho (COELHO *et al.*, 2008). Considerando-se o período de quatro meses para completar o ciclo da cultura, e que essa carga de nitrogênio é aplicada toda vez que última lagoa de tratamento chega ao limite, pode-se supor que provavelmente o nitrogênio não perdido por volatilização pode ser carregado por lixiviação com alto potencial de poluição para o meio ambiente, caso o efluente tratado seja aplicado por mais de três vezes no solo nesse período.

Mendonça *et al* (1999) encontraram uma dose de 319,47 kg de N/ha em plantações de milho em solos que também receberam fertirrigação (MENDONÇA *et al.*, 1999). Alguns países europeus estimaram o máximo de nitrogênio aplicado no solo, variando de 170 a 250 kg/ha.ano . Supondo que a aspersão ocorra sete vezes ao ano no presente estudo de caso, já passaria do limite sugerido por esses países (REZENDE, V.D.O, 2013).

Tabela 9- Valores de COT e NT das amostras do efluente tratado

Coleta	Data da coleta	Teor	
		COT (mg/L)	NT (mg/L)
A1	20/01/2020	395	-
A2	17/08/2020	708	-
A3	15/03/2021	1128,83	4193,0
A4	12/04/2021	405,17	876,5
Média		659,3	2534,5
DP		298,9	1658,3

Fonte: a autora. Carbono orgânico total – COT.DP refere-se ao desvio padrão das amostras de efluente tratado. As amostras de açude e de efluente faltantes foram perdidas devido à problemas de armazenamento das amostras na primeira amostragem. O teor de NT estava abaixo do limite detectável na Coleta 1 e coleta 2 (2,5 mg/L). A1: coleta 1, A2: coleta 2, A3: coleta 3, A4: coleta 4.

5.1.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS DOS SOLOS

5.1.2.1 Granulometria

A análise da granulometria através de triângulo textural permitiu a classificação do solo 1 como franco argilo arenoso, e o solo 2 como franco arenoso (LEMOS & SANTOS, 1996). O solo 1 possui maior teor de argila, aproximadamente o dobro do que o solo 2 e menor teor de areia, cerca de 36% a menos (Tabela 10).

Tabela 10- Distribuição granulométrica da amostragem de solo 1 e solo 2 (%) (n=15)

Grão	Solo 1	Solo 2
Argila	26,64	13,41
Silte	20,29	14,27
Areia	53,06	72,32

Fonte: a autora.

Uma provável resposta à essa diferenciação textural dos solos se deve à variação topográfica, já que o solo 1 situa-se em área de maior declividade, o que intensificaria a lavagem da camada superficial pelo escoamento das chuvas e propiciaria, conseqüentemente, o transporte da areia para a área de baixada. Como o solo 2 localiza-se em área de baixada, provavelmente, este acumularia a areia lixiviada na superfície do solo.

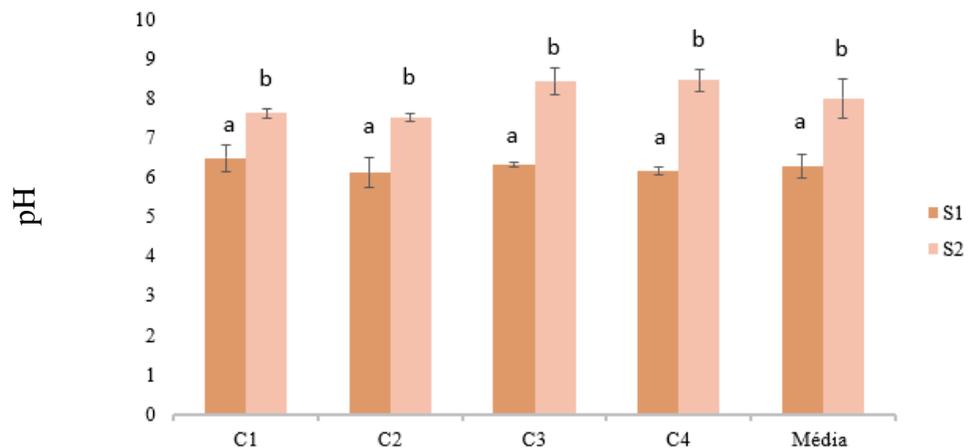
A granulometria do solo pode influenciar na diversidade dos microrganismos, já que a relação do microrganismo com o solo interfere diretamente em sua sobrevivência, sucessão e

interações com outros microrganismos do ambiente. Os agregados do solo conferem proteção, menor vulnerabilidade à remoção do habitat, além da adesão aos nutrientes. As interações entre a carga positiva da bactéria com baixo pH e carga negativa da argila são exemplos de interações observadas entre bactérias e solo (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

5.1.2.2 pH das amostras de solo

De acordo com os valores apresentados na Figura 4, nota-se que o pH médio total (n=20) no S1 ($6,3 \pm 0,3$) é menor ($p < 0,05$) que o S2 ($8 \pm 0,5$). Em relação à quantificação de pH por coleta (n=5), o pH também foi considerado menor ($p \leq 0,05$) no S1 do que no S2 em todas as coletas, variando de 6 a 7 do S1 e de 7 a 9 unidades no S2 entre as coletas. O S1 foi classificado quimicamente como de acidez fraca e o solo 2 como de alcalinidade elevada (BETTIOL, 2000).

Figura 4- pH médio das amostras de solo S1 e S2



Legenda: Solo fertirrigado (S1), Solo à jusante (S2), N=5 para cada coleta e n=20 para a média total. Barras de erro significam desvio padrão (n=5 para cada coleta e n=20 para a média total). C1: coleta 1, C2: coleta 2, C3: coleta 3, C4: coleta 4. Fonte: a autora.

Grande parte dos solos já são naturalmente ácidos, contudo, o manejo agrícola pode intensificar esse processo através da ciclagem de matéria orgânica – liberando ácidos orgânicos-, por meio exportação de nutrientes no solo e da lixiviação. Além disso, a acidez depende de fatores característicos do solo, como a saturação por alumínio e por bases e disponibilidade de nutrientes e micronutrientes (EMBRAPA, 2021).

Alguns estudos não observaram influência da aplicação de efluente residuário na acidez ou alcalinidade do solo. Han *et al* (2016) notaram variação de pH de 4 a 6 em solos que receberam

água potável/de chuva e de 4 a 7 unidades aproximadamente em solos que receberam água recuperada. Enquanto Oliveira *et al* (2014), em solo tropical, observaram pH em torno de 5 unidades solos irrigados com em águas residuárias da suinocultura para fertirrigação de cultivos anuais e solo testemunha em escala de laboratório. Silva (2016), que também não observou diferenças significativas após a aplicação da fertirrigação em amostras de solo e mencionaram um provável potencial de tamponamento do solo, com valores de pH variando de 4 a 5 unidades, com amostras de solo com pH menor do que as do presente estudo.

A alcalinidade do solo 2 mostrou estar acima do encontrado na região (ANDRADE *et al.*, 2012; LINHARES *et al.*, 2010). Por estar em área de baixada, o acúmulo de bases catiônicas advindas do topo de morro da parte superior do terreno pelo escoamento superficial contribui possivelmente para o aumento do pH nessa área.

É válido destacar que grande parte dos estudos em solo referente às sulfonamidas relatou forte dependência desse antibiótico com o pH, ressaltando a importância desse parâmetro no que tange à permanência desse antibiótico no ambiente. Coeficientes de sorção dos antibióticos sulfacloropiridazina, tilosina e oxitetraciclina, utilizados na pecuária intensiva, por exemplo, mostraram ser maiores em solos mais ácidos. (KURWADKAR *et al.*, 2007; PENÊDA, P. A. B. F., 2016; TER LAKK *et al.*, 2006).

Já foi observado também alteração das estruturas de comunidades bacterianas devido à variação de pH e aumento do potencial de transferência de genes de resistência à tetraciclina em pH ácidos e inibição desses em pH mais alcalino em lodo residual, o que corrobora com os resultados obtidos no presente estudo em que o solo 1 possui maior número de genes de resistência à tetraciclina e sulfonamidas do que o solo 2. (HUANG *et al.*, 2016).

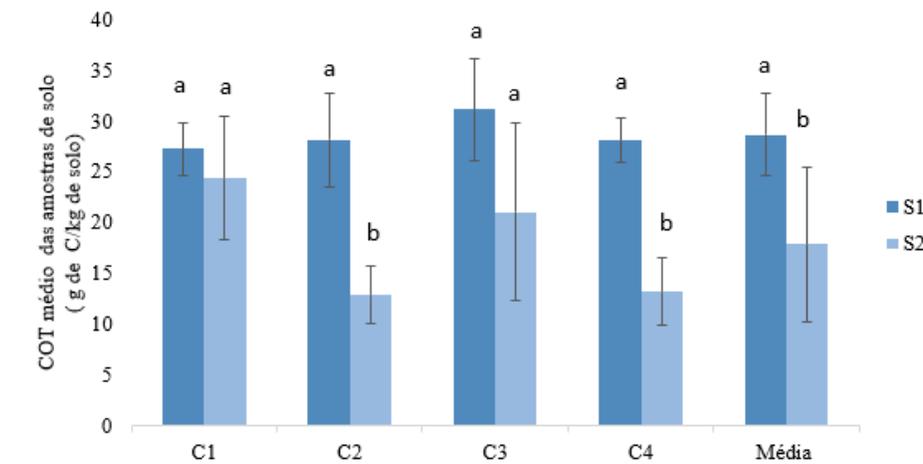
5.1.2.3 Carbono orgânico total e nitrogênio total nas amostras de solo

Quanto ao COT (Figura 5) e NT (Figura 6), notou-se concentrações maiores desses elementos ($p < 0,05$, $n=20$) no S1 (28,6 e 0,3 g/kg), em comparação ao S2 (17,8 e 0,12 g/kg). Em relação à quantificação de COT por coleta ($n=5$), as coletas 2 e 4 apresentaram maior quantidade de COT ($p \leq 0,05$) no S1, variando de 22,1 a 40,4 no S1 e de 7,84 a 30,67 mg de C/g de amostras entre as coletas no S2.

A maior concentração de COT do solo 1 deu-se na coleta 3 (31,1 g de COT/kg de solo) coincidindo com a maior concentração de COT no efluente tratado coletado no mesmo dia, também

na coleta 3 (1129 mg de COT/L de efluente) enquanto no solo 2, que não recebeu fertirrigação, a maior concentração de COT ocorreu na coleta 1 (24,38 g/kg). Na terceira coleta, o solo revolvido com as palhas e resíduos, misturado à matéria orgânica da superfície e o efluente com a maior carga orgânica entre as coletas amostradas possivelmente contribuíram para o aumento da carga orgânica do solo 1 na coleta 3 em relação às outras coletas.

Figura 5- Carbono orgânico total -COT das amostras de solo S1 e S2



Fonte: autora . Solo fertirrigado (S1), Solo à jusante (S2), N=5 para cada coleta e n=20 para a média total. Barras de erro significam desvio padrão (n=5 para cada coleta e n=20 para a média total).

Foram encontrados menores teores de COT em solos não cultivados na literatura, como 6,4 a 24,9 de g/kg de CO, na região Campo das Vertentes, mesma região da área de estudo e um teor de 12,2 a 34,5 g/kg de C na região do quadrilátero ferrífero, próximo sobretudo ao local de estudo, com apenas uma das amostras de solo superficial (0 a 8 cm de profundidade) acima do encontrado no presente estudo (34,5 g/kg de C), que pode indicar a possibilidade da fertirrigação no aumento de matéria orgânica no solo do empreendimento. Em um estudo no estado de Santa Catarina, um dos maiores produtores de carne suína no Brasil, também foram observados menores teores de carbono orgânico, mesmo após aplicação de dejetos suínos, com variação das amostras na faixa de 9,7 a 20 g/kg.

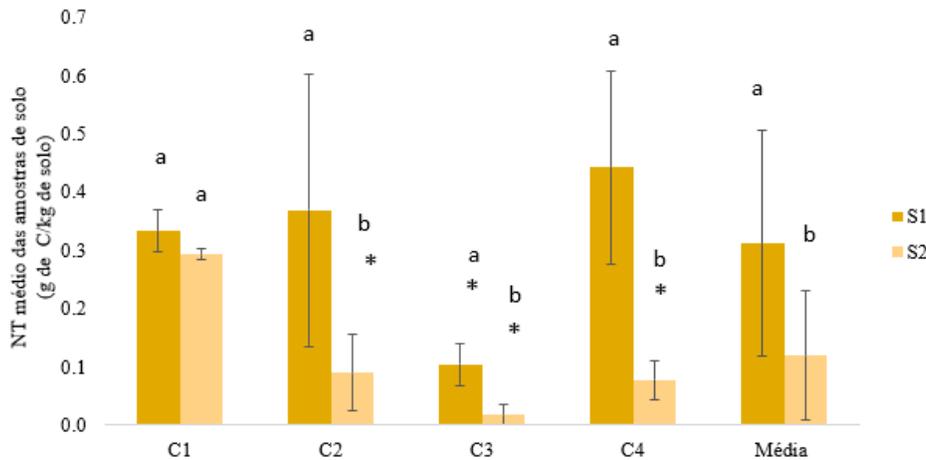
Neste último estudo, solos alterados em que havia cultivo de milho e amostras de solo que não receberam esses resíduos, tiveram teores de COT semelhantes, de aproximadamente 10 g/kg, mesmo com diferença de treze anos de aplicação de dejetos entre algumas amostras, não havendo

diferenciação entre essas amostras de solo e as isentas de dejetos (CARVALHO FILHO, *et al.*; 2010; FERREIRA *et al.*, 2011; RAUBER *et al.*, 2010).

O balanço de carbono orgânico do solo e a mineralogia da fração da argila podem influenciar diretamente na formação e na estabilidade dos agregados no solo. É importante destacar que a agregação do solo é uma das consequências da longa aplicação de água residuária e pode influenciar diretamente na diversidade dos microrganismos presentes no sistema (AGNE e KLEIN, 2014; GUBANI *et al.*, 2007; NETO *et al.*, 2016)

Quanto ao NT, as amostras da coleta 3 do S1 e das coletas 2, 3 e 4 do S2 estavam abaixo do limite de detecção do nitrogênio, variando de 0,01 a 0,79 no S1 e de 0 a 0,3 mg de N/g no S2. A quantificação de NT foi maior ($p \leq 0,05$) no S1 nas coletas 2, 3 e 4.

Figura 6- Nitrogênio total - NT das amostras de solo S1 e S2



Fonte: autora. Solo fertirrigado (S1), Solo à jusante (S2), N=5 para cada coleta e n=20 para a média total. Barras de erro significam desvio padrão (n=5 para cada coleta e n=20 para a média total). * Abaixo do limite de detecção do equipamento (2.5 mg/L).

De modo geral, a determinação de nitrogênio não é comumente realizada, devido à complexidade da dinâmica desse elemento no solo, influenciada pela umidade, temperatura, pH, atividade microbiana, entre outros fatores (PREZZOTI e GUARÇONI, 2013). Contudo, o maior teor de nitrogênio no solo 1 em comparação ao solo 2 pode ter relação à fertirrigação, já que esta contém naturalmente nitrogênio, principalmente o amoniacal, oriundo dos dejetos suínos (SCOLARI, 2016).

Apesar da caracterização semelhante de solo – Latossolo Vermelho-Amarelo Distrófico-da Silva e colaboradores (2016) detectou valores de nitrogênio muito acima dos encontrados no presente estudo em amostras do solo não fertirrigado (S2), em solos de cultivo de soja, com teor de NT de 80 g/kg, aproximadamente. Todavia, não encontraram aumento significativo entre amostras de solo fertirrigado e não fertirrigado (aproximadamente 75 g/kg de solo). A metodologia aplicada (oxidação úmida) pode ter contribuído para essa diferenciação do teor de nitrogênio entre esses estudos.

5.1.3 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS DE ÁGUA DO AÇUDE

A quantificação média de COT (n=3) da água do açude foi de $13,6 \pm 8,5$ mg/L. Quanto ao teor de NT, a média do afluente foi $3,0 \pm 0,7$ (n=2) mg/L, os dados referentes a cada coleta estão listados na Tabela 11. O açude parece não ter sido impactado pelo aporte de matéria orgânica advindo do efluente tratado, possivelmente pela distância da aplicação do efluente, que se situa a aproximadamente 338 m de distância do local do açude, em menor altitude.

Tabela 11- Valores de COT e NT das amostras do açude

Coleta	Data da coleta	COT (mg/L)	NT (mg/L)
C1	20/01/2020	-	-
C2	17/08/2020	4,04	-
C3	15/03/2021	24,64	2,33
C4	12/04/2021	12,09	3,67
Média		13,6	3
DP		8,5	0,7

Fonte: a autora. Carbono orgânico total – COT. DP refere-se ao desvio padrão das amostras do açude. As amostras de açude faltantes foram perdidas devido à problemas de armazenamento das amostras na primeira amostragem. O teor de NT estava abaixo do limite detectável na Coleta 1 e coleta 2 (2.5 mg/L).

5.2 ABUNDÂNCIA DOS EGR A ANTIBIÓTICOS

Considerando que na prática de manejo da suinocultura há o oferecimento de antibióticos, tanto para fins terapêuticos quanto como promotores de crescimento, especula-se que os dejetos dos animais possam conter microrganismos resistentes a estes fármacos, e que, com a prática de fertirrigação do solo com esses dejetos (brutos ou tratados), há, portanto, um risco de disseminação destas bactérias no meio ambiente.

Para investigar isso, cinco genes de resistência a antibióticos e um gene que codifica o elemento móvel *integron*, foram monitorados em diferentes pontos de uma área submetidas á fertirrigação, a saber solo 1 (S1 fertirrigação constante), solo 2 (S2 sem fertirrigação direta localizado à jusante à área irrigada), água do açude (A, localizado à jusante à área fertirrigada), além do efluente tratado (ET, usado na fertirrigação do solo) em quatro campanhas experimentais.

As apresentações quantitativas dos genes de resistência serão expressas de duas formas: uma forma é a absoluta, que representa a quantidade total do referido gene por unidade de amostra (gramas ou mililitros). Esta forma de apresentação do resultado é útil para comparar a dinâmica dos genes entre as amostras analisadas, mas de difícil comparação com a literatura devido à limitações da técnica. Para isso a apresentação na forma relativa, que considera a relação entre a quantidades do gene de resistência com a quantidade do gene RNAr 16S de bactérias é mais utilizada.

Todos os genes investigados (*ermB*, *tetA*, *sul1*, *int1*, *qnrB*, *blaTEM*) e o elemento genético móvel *int1* foram detectados em todas as campanhas no S1, S2, A e E, com exceção do gene *qnrB*, que esteve abaixo do limite de detecção do método analítico no S2 na coleta 1 e do S1 e S2 em 80% das replicatas da coleta 3 e 4 (Figura 9).

5.2.1ANÁLISE DE EGR NO EFLUENTE TRATADO

A abundância absoluta média de GRAs no efluente tratado variou de 4,97 a 7,47 log₁₀ de cópias de gene/mL de efluente tratado entre as coletas. O gene *sul1* deteve a maior quantificação nas amostras (7.47 log₁₀), com ordem: *sul1*>*ermB*>*qnrB*>*blaTEM*>*int1*>*tetA*, com abundância absoluta média superior à abundância do gene RNAr16S, que representa as bactérias totais presentes nas amostras (5,9 log₁₀, variando de 5,2 a 6,1 log₁₀).

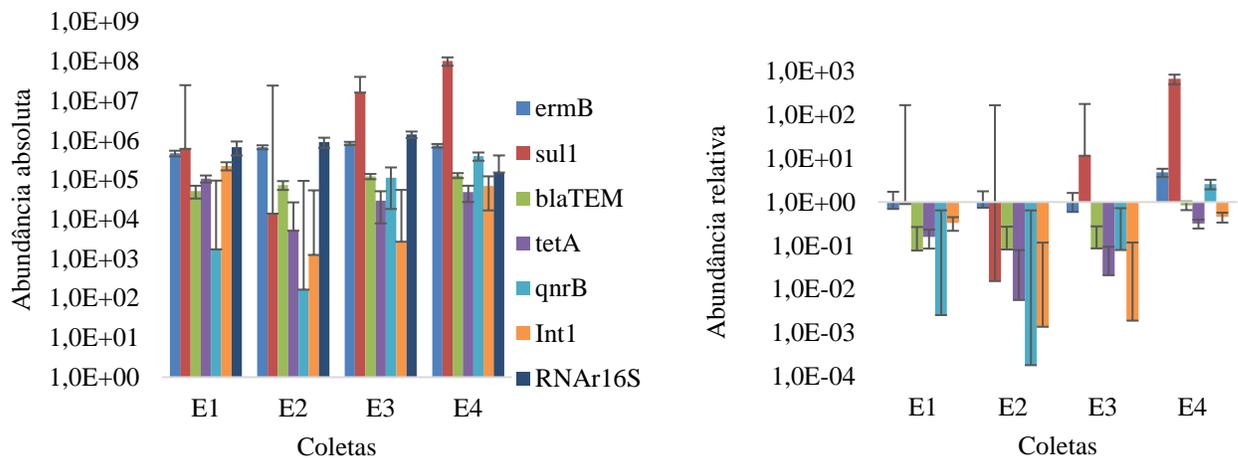
Houve variação da abundância relativa na faixa de -0,17 a 2,23 log₁₀ de cópias de GRAs/RNAr 16S, acima da faixa de detecção encontrado por Kampouris *et al*, 2021 (cerca de -8 a -2 log₁₀) que também contemplaram em seus estudos os genes *int1*, *sul1*, e *blaTEM* em águas residuárias tratadas. Em outro estudo, GRAs a tetraciclina e sulfonamidas (*tetM*, *tetO*, *tetW*, *sul1* e *sul2*) foram detectados em menor abundância relativa do que a média do efluente tratado do presente estudo (cerca de -2,0 log₁₀) em efluentes residuários de suínos (Ben *et al.*, 2017).

Negreanu *et al* (2012) também observaram abundâncias relativas de genes *sul1* e *ermB* aparentemente inferiores às deste estudo (aproximadamente -3 a -2 log₁₀ de *sul1*, e -4 a -6 log₁₀ do

gene *ermB*) em amostras de efluente residuário de planta de tratamento de esgoto. Os dados absolutos e relativos da quantificação dos elementos de resistência do efluente tratado estão listados no Apêndice A, enquanto sua forma graficada é apresentada na Figura 7.

A abundância relativa do gene *sulI* no efluente tratado foi de aproximadamente 2,23 \log_{10} de cópias de gene *sulI*/RNAr 16S (variando de -1,81 a 2,82 \log_{10} entre coletas), enquanto do gene *ermB* variou de -0,23 a 0,68 \log_{10} entre as médias de abundância relativa das coletas. A abundância relativa com valor positivo pode indicar a possibilidade de haver mais de um gene por bactéria ou que parte dos genes de resistência persistem no ambiente mesmo após a morte das bactérias, e poderiam estar livres no ambiente, como fragmentos genéticos.

Figura 7- Número de cópias de genes/g mL de amostras em todas as coletas de efluente



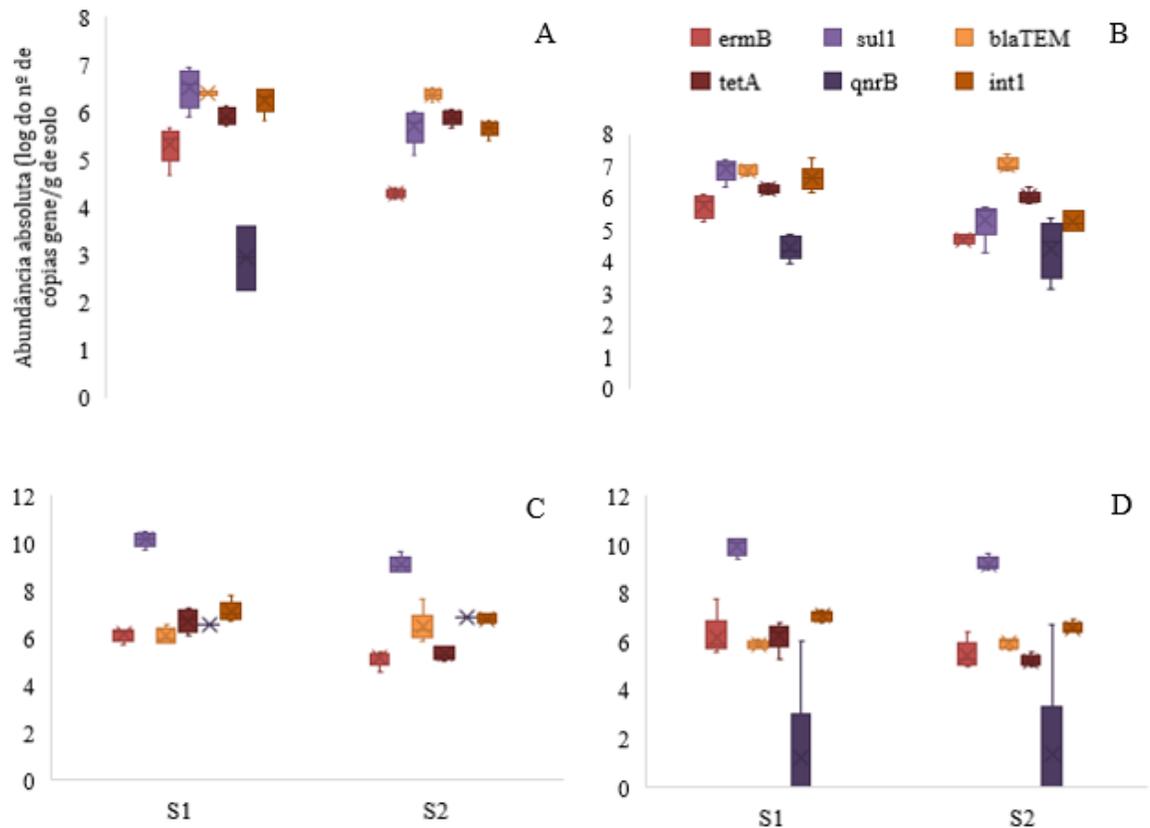
Fonte: a autora. E1: efluente tratado da coleta 1 (jan/2020), E2: efluente tratado da coleta 2 (ago/2020), E3: efluente tratado da coleta 3 (mar/2020), E4: efluente tratado da coleta 4 (abr/2020).

5.2.2 ANÁLISE DE EGR NAS AMOSTRAS DE SOLO

A abundância absoluta média de GRAs no S1 variou de 6,06 a 9,85 n° de cópias gene/g de amostra (Figura 8). Os genes com maior abundância absoluta nas mostras de solo S1 (n=20) foram *sulI* e *int1*, com média total de 9,8 e 7,0 \log_{10} n° de cópias gene/g amostra, respectivamente, seguindo a ordem *sulI* > *int1* > *ermB* > *tetA* > *blaTEM* > *qnrB*.

As amostras do S1 apresentaram variação da abundância relativa na faixa de $-3,32$ a $0,47$ \log_{10} de cópias de GRAs/ RNAr 16S (Figura 9). O gene *sul1* destacou-se pela maior quantificação, com média de $0,47$ \log_{10} , maior que a encontrada em alguns estudos envolvendo solo fertilizado como os Negreanu *et al* (2012), cerca de -6 a -3 \log_{10} e das abundâncias relativas encontradas por Wang *et al* (2014) e Kampouris *et al* (2021), aproximadamente -3 \log_{10} de *sul1*/RNAr 16s.

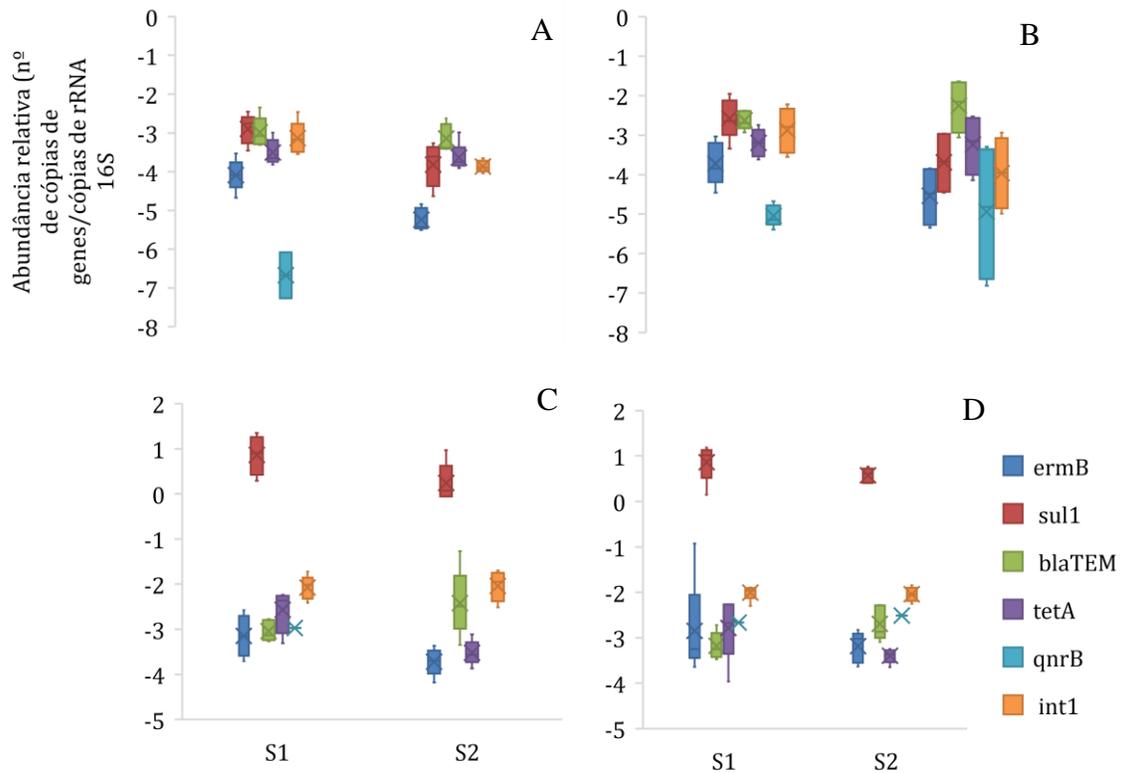
Figura 8- Abundância absoluta das amostras de solo 1 e solo 2 por coleta



Fonte: a autora. Abundância absoluta: nº de cópias de gene/g de solo. S1: solo fertilizado; S2: solo não fertilizado, à jusante. A: coleta 1, B: coleta 2, C: coleta 3, D: coleta 4. Barras de erro significam desvio padrão. O gene *qnrB* não foi quantificado nas coletas 1 no S2 e em quatro replicatas da coleta 3 e coleta 4. Limite de detecção de *qnrB* - 1×10^2 cópias/g de solo, nas coletas 1 e $8,00 \times 10^5$ cópias/g de solo nas coletas 3 e 4).

O gene *qnrB* foi o menos abundante nas amostras de S1, com média de $6,0$ \log_{10} . É importante ressaltar que entre as 20 (vinte) amostras de solo coletadas, apenas 11 estavam acima do limite de detecção para o gene *qnrB* (coleta 1: $4,0 \times 10^2$, coleta 3 e 4: $8,0 \times 10^5$). Nas amostras S2, 13 (treze) amostras tiveram quantificação do gene *qnrB* abaixo do limite de detecção da reação.

Figura 9- Abundância relativa das amostras de solo 1 e solo 2 por coleta



Fonte: a autora. S1: solo fertirrigado; S2: solo não fertirrigado, à jusante. A: coleta 1, B: coleta 2, C: coleta 3, D: coleta 4. Barras de erro significam desvio padrão. O gene *qnrB* não foi quantificado nas coletas 1 no S2 e em quatro replicatas da coleta 3 e coleta 4. Limite de detecção de *qnrB* - 1×10^2 cópias/g de solo, nas coletas 1 e $8,00 \times 10^5$ cópias/g de solo nas coletas 3 e 4).

Genes *sul1* e *tetA* foram mais abundantes estatisticamente ($p < 0,05$) no S1 do que no S2, quando a análise estatística foi realizada com todas as replicatas de todas coletas. Ao analisar cada coleta separadamente, percebeu-se um padrão diferente quanto aos genes *tetA* e *ermB*, em que a abundância absoluta do gene *ermB* foi maior ($p < 0,05$) no solo fertirrigado nas coletas 1, 2 e 3 e de *tetA* foi maior apenas nas coletas 3 e 4, além do gene *int1*, que esteve em maior ($p < 0,05$) quantificação nas coletas 1, 2 e 4 nessas amostras. O gene *sul1* foi estatisticamente maior no solo fertirrigado do que no solo não fertirrigado em todas as coletas. Dessa forma, a fertirrigação pode estar contribuindo para o aumento dos genes *ermB*, *tetA* e *sul1* e *int1* no solo.

Apesar de não receber efluente tratado irrigado diretamente, todos os genes estudados também foram detectados nas amostras do S2. A abundância absoluta média de GRAs no S2 variou de 5,53 a 8,95 n° de cópias gene/g de amostra de solo. O gene *sul1* também foi o gene mais abundante entre os genes investigados com abundância média absoluta e relativa de $7,33 \log_{10}$

respectivamente, seguido de *blaTEM* e *int1* (6,45 e 6,07 log₁₀) com *ranking* de genes *sul1>blaTEM, int1>qnrB>tetA>ermB*.

A quantificação relativa dos GRAs no S2 variou de -,043 a -4,06 n° de cópias de GRAs/rRNA 16S. A abundância relativa do gene *sul1* (0,25 log₁₀) foi consideravelmente maior do que a encontrada em outros estudos na literatura, como os de Negreanu *et al* (2012), Ben *et al* (2017) e Kampouris *et al* (2021), que encontraram abundância relativa em torno de -4 a -8 log₁₀ em solos não irrigados com efluente tratado.

A considerável abundância dos mesmos GRAs detectados no S1 nas amostras do solo S2 pode dever-se à proximidade com a câmara do biodigestor de dejetos do suíno. Nas proximidades desse equipamento foi observada uma área de vazamento direto de dejetos brutos no solo. Assim, é possível que devido à ocorrência de chuva os EGR da lavagem do efluente bruto transitem dessa área ao Solo 2 estudado, contribuindo para o aumento de GRAs no solo.

É importante ressaltar que também já foram detectadas quantificações de GRAs expressivas em solos considerados intocados pela atividade antrópica como em solos na Antártica e em solos tibetanos inexplorados (Wang *et al.*, 2016, Li *et al.*, 2020). Foi encontrada abundância relativa em solos tibetanos prístinos na faixa de -1,3 a -0,55 log₁₀ cópias de GRA/cópias de genes 16 rRNA, dentro da faixa encontrada no presente estudo no S1 e no S2 .

Os GRAs encontrados no solo tibetano conferem resistência a antibióticos menos comuns, como a como glicopetida e rifampicina. Já em ambientes de impacto humano direto, inclusive em solo Tibetano sob influência antrópica, há uma tendência de GRAs mais comumente encontrados na literatura, como fosmidomicina, bem como aminoglicosídeo, bacitracina com destaque aos macrolídeo-lincosamida-estreptogramina, fluoroquinolona e tetraciclina(LI *et al.*, 2020).

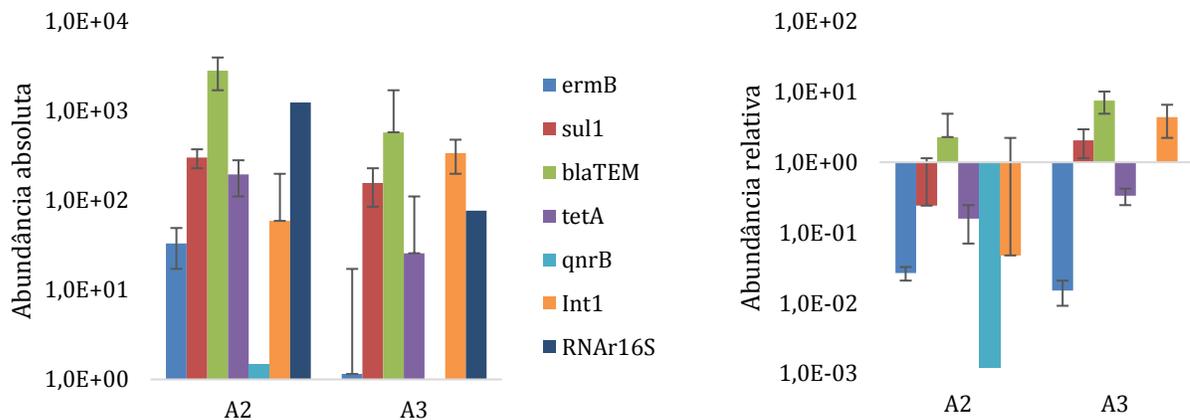
5.2.3 ELEMENTOS GENÉTICOS DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS NA ÁGUA DO AÇUDE

A abundância absoluta média de GRAs nas amostras de água do açude variou de -0,12 a 3,23 log₁₀ de cópias gene/g de amostra (Figura 10). As amostras de água do açude apresentaram um padrão diferenciado das outras amostras em estudo, com maior abundância absoluta e relativa referente aos genes *blaTEM* (3,1 e 0,62 log₁₀ respectivamente), seguido dos seguintes elementos genéticos para a abundância absoluta e relativa (n=2): *blaTEM>sul1>int1>tetA>ermB>qnrB*. Já a abundância relativa dos GRAs variou de -3,22 a 0,69 log₁₀ cópias de GRAs/rRNA 16S.

Dong *et al* (2019), detectaram abundâncias relativas menores em um sedimento de um lago urbano na China (aproximadamente -2 a $-4 \log_{10}$ cópias de GRAs/rRNA 16S). Arsand *et al* (2020) encontraram o gene *blaTEM* como o mais abundante em amostras de um rio no Brasil, considerado afluyente de natureza doméstica.

Contudo, um estudo realizado anteriormente em amostras de águas de lagos também detectou genes resistentes a sulfamidas como os mais abundantes, em que o gene *sulI* foi mais bem explicado pela proximidade de estações de tratamentos de águas residuais e efluentes de hospitais, variando de -3 a $-1 \log_{10}$ cópias de *sulI*, valores menores do que os encontrados no presente estudo (CZEKALSKI, 2015). A quantificação dos elementos de resistência referentes às amostras coletadas da água do açude encontra-se no Apêndice B.

Figura 10- Abundância absoluta e relativa de GRAs (genes/mL) de amostra de água do açude



Fonte: a autora. A2: Coleta 2 (ago/2020), A3: coleta 3 (mar/2021). Barras de erros correspondem ao desvio padrão das amostras.

5.2.4 COMPARAÇÃO DA ABUNDÂNCIA DE GENES DE RESISTÊNCIA ENTRE AMOSTRAS DE SOLO, EFLUENTE TRATADO E DE ÁGUA DO AÇUDE

A abundância média de GRAs total neste estudo foi representada pelo somatório das médias dos genes *blaTEM*, *ermB*, *qnrB*, *sulI* e *tetA* das amostras de efluente tratado, solo e de água do açude. A abundância de GRAs total do efluente tratado foi de 4.24×10^6 ($6.62 \log_{10} \pm 7 \times 10^6$). No solo 1, a abundância referente à média de todas as coletas ($n=20$) foi de aproximadamente 3.10×10^{10} ($10.5 \log_{10}$) $\pm 3.18 \times 10^{10}$. Quanto ao solo 2, foi de 4.5×10^9 ($9.6 \log_{10}$) $\pm 4.5 \times 10^9$ e do açude 4.18×10^3 ($3.62 \log_{10}$) $\pm 3.59 \times 10^3$. A maior abundância absoluta de GRAs total no solo 1 e

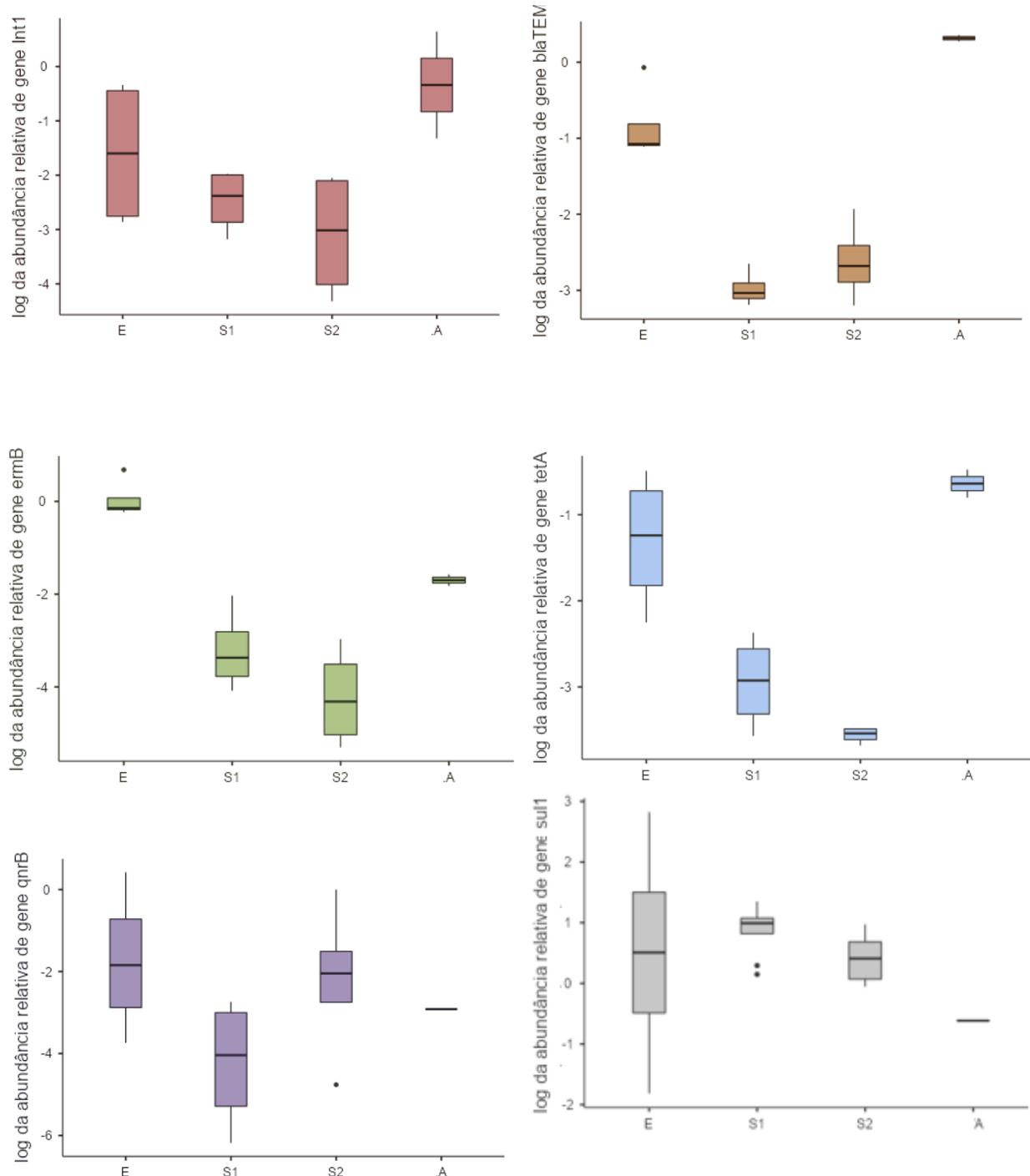
no efluente tratado coincidiram na coleta 3 (Figura 11), além do maior teor de carbono total ter se dado também na coleta 3, como mencionado anteriormente. Não houve diferença significativa de GRAs entre as amostras de solo 1 e solo 2 solo ($p \leq 0,05$) quando a estatística foi realizada com o somatório de todos dados relativos dos GRAs.

A diminuição dos valores relativos em relação aos valores absolutos das amostras estudadas sugere uma queda na proporção entre os genes de resistência em relação às bactérias no ambiente, possivelmente pela diminuição de cópias do gene de resistência em relação à quantidade de cópias do RNAr 16S. Quanto aos dados relativos, é possível perceber um decaimento de GRAs de até um $1 \log_{10}$ de número de cópias entre o solo 1 e solo 2, contudo, não houve diferença estatística ($p < 0,05$) dos dados relativos dos GRAs ao comparar as duas amostras de solo, que se assemelharam muito. Apesar de não ser possível comparar a abundância relativa do efluente tratado à da água do açude, devido ao pequeno número amostral, nota-se em primeira análise uma menor quantificação de GRAs no ambiente do açude do que nos demais, sendo esse ambiente um possível sumidouro de GRAs (GAO *et al.*, 2018; ZHANG, 2021).

Ao se comparar a abundância relativa do efluente tratado e o solo que recebeu esse efluente, nota-se uma diferença de até $3 \log_{10}$ de GRAs, refletindo uma maior quantificação significativa ($p < 0,05$) quanto aos genes *ermB*, *blaTEM* e *tetA* (Figura 11) no efluente do que no solo 1 (com decaimento de 3,06; 3,15 e 2,31 \log_{10} da abundância relativa respectivamente). Esses resultados podem levar à hipótese de que ocorre uma diminuição da quantidade de GRAs após o lançamento do efluente tratado no solo, possivelmente pela mudança das condições ambientais, diferença do microbioma, temperatura, entre outros fatores e que a fertirrigação não parece ter influenciado na quantificação de GRAs totais no solo 1, já que uma quantidade semelhante foi encontrada no solo 2.

Pereira (artigo em produção), que também investigou o efluente tratado da mesma suinocultura com maior número de amostragens -nove coletas, incluindo as quatro do presente estudo, encontrou médias de abundância relativa menores do que as deste estudo, com diferença de até $3 \log_{10}$ para o gene *sull* e *qnrB*. Vários são os fatores que podem ter interferido sobre a menor quantificação como o período das amostragens anteriores, pluviosidade – auxiliando na diluição da carga de GRAs, temperatura do sistema, operação na análise biomolecular, antibióticos aplicados em períodos posteriores entre outros parâmetros.

Figura 11- Abundância relativa de cada gene por amostra (log)

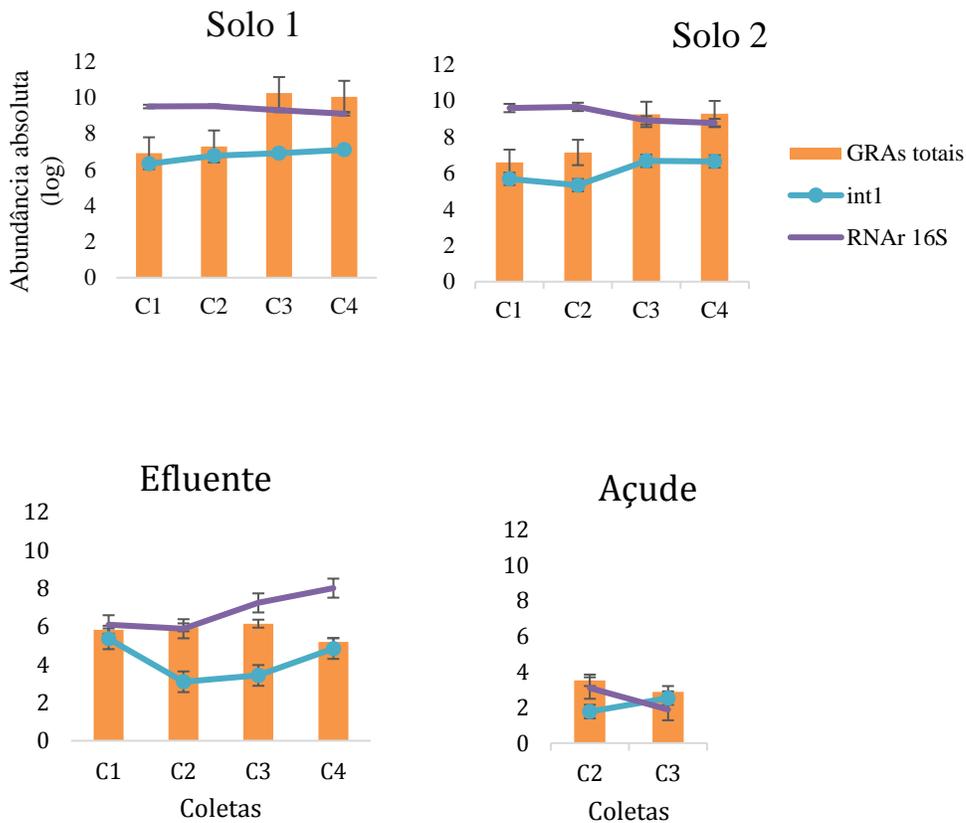


Fonte: a autora. Abundância relativa (log do nº de cópias de gene/RNAr 16S). E: Efluente tratado (n=4), S1: solo fertilizado com o efluente tratado (n=20), S2: solo à jusante do solo 1 (n=20) e A :açude à jusante do solo 2 (n=2).

É possível perceber ainda um decaimento sutil da quantificação de bactérias totais nos dois solos – S1 e S2, entre as coletas 1 a 4 (Figura 12), representado pelo gene RNAr 16S e um sutil

aumento de genes *int1*, podendo representar o aumento da transferência horizontal de genes no meio, assim, percebeu-se um comportamento proporcional nos dois solos. Quanto ao efluente tratado, nota-se um aumento das bactérias totais, configuração diferente da observada nas amostras de solo, possivelmente pela entrada constante de bactérias presentes do sistema de tratamento.

Figura 12: Número de cópias (em log) de cópias dos genes estudados



Fonte: a autora. C1: coleta 1, C2: coleta 2, C3: coleta 3, C4: coleta 4. GRA totais: soma da quantificação dos genes *ermB*, *sul1*, *qnrB*, *blaTEM* e *tetA*.

Apesar do gene *sul1* ter sido detectado em maior abundância nas amostras S1, S2 e E (média de 9.81 e 8.95 \log_{10} cópias de genes *sul/g* de solo e 7.47 \log_{10} gene/mL de amostra, respectivamente) não foi encontrado aumento ou diminuição significativa ($p < 0,05$) desse gene entre a abundância relativa das amostras. Contudo, já foi encontrado encontrou correlação positiva entre o gene *sul1* e a intensidade de irrigação com água residuária (Kampouris *et al.*, 2020), além do mesmo gene também ter sido o mais abundante nas amostras investigadas por Ben *et al.* (2017);

Um fato preocupante é que o gene *sulI* também já foi encontrado em solos primitivos em alta abundância, no interior da região conservada 3' da integrase *intI*, que pode oportunizar a permanência do gene *sulI* dentro do ambiente nativo (PARTRIDGE 2009, WANG, 2014). Esse fato pode sugerir que talvez o gene *sulI* seja persistente nos ambientes.

Estudos indicaram que o despejo de efluentes residuários da suinocultura e estrumes suínos contribuíram para a disseminação de GRAs em ambientes adjacentes, como em sedimentos de rios (Ben et al., 2017). O mais alarmante é que com a prática da fertirrigação, genes de resistência a antibióticos podem incorporar-se às plantações com o auxílio de elementos genéticos móveis como os plasmídeos, integron e posteriormente no corpo humano através da cadeia trófica, que pode prejudicar a saúde da população (GU et al., 2020; WEN et al., 2019 ; UDIKOVICKOLIC et al., 2014)

No açude à jusante do solo 1 e solo 2 percebeu-se uma maior abundância relativa do gene *blaTEM* (média de 0.31 log, n=2), mas em menor abundância nas amostras de solo e do efluente tratado (-2.88, -2.59, -0,57 solos 1 e solo 2 e efluente tratado, respectivamente). Apesar da menor amostragem dos dados (n=2), notou-se que a maior abundância relativa dos genes *blaTEM* (mecanismo enzimático de resistência) e *tetA* (bomba de efluxo) e a integrase *intI* ocorreram no açude. Já os genes *ermB* (mecanismo de alteração no alvo do antibiótico) e *qnrB* (mecanismo enzimático de resistência) apresentaram maior abundância nas amostras de efluente tratado e o gene *sulI* (mecanismo de alteração do alvo do antibiótico) apresentou maior abundância relativa nas amostras de solo.

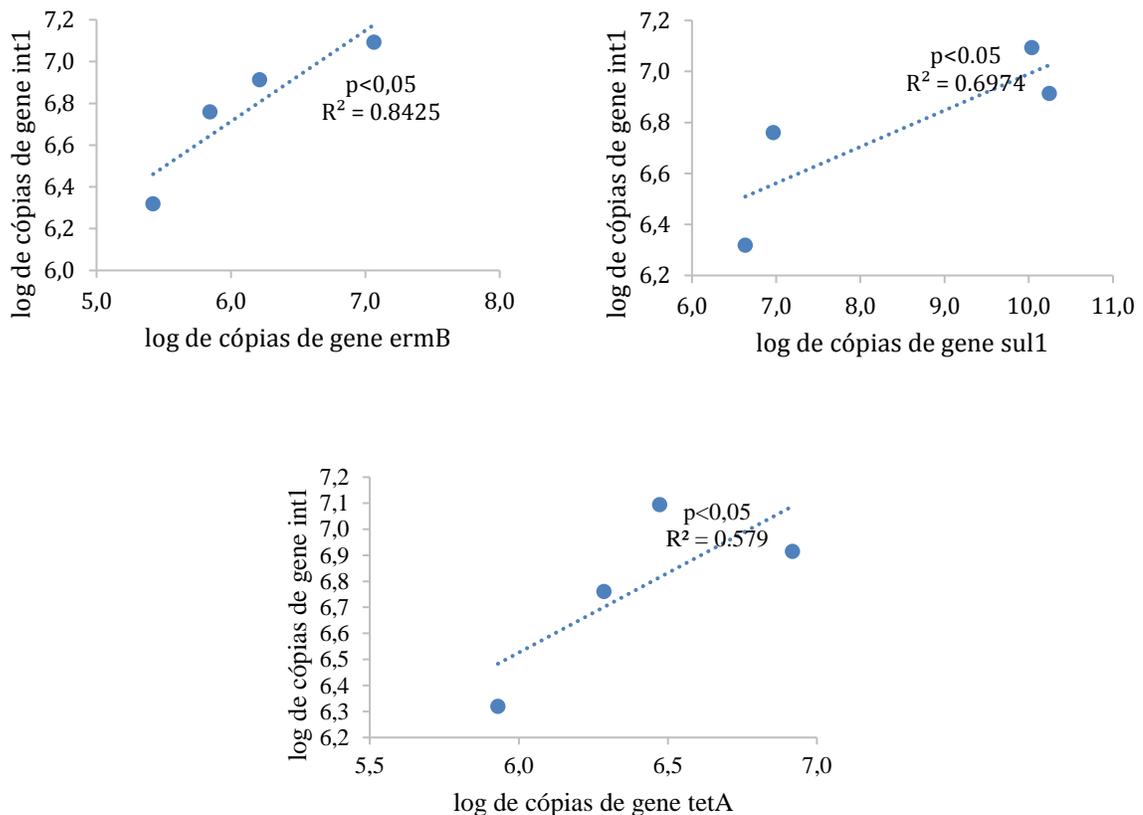
5.3 CORRELAÇÃO ENTRE GRAS E PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS NAS AMOSTRAS DE SOLO E DO EFLUENTE TRATADO

Quando se analisou os dados com as replicatas quanto à normalidade, os dados das amostras do solo 1 e do solo 2 foram considerados não paramétricos, utilizando-se assim, a correlação de Spearman para verificação da existência de correlação entre as variáveis de cada solo. Os dados de normalidade e correlação estão no Apêndice (E e F).

5.3.1 CORRELAÇÃO ENTRE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS E A INTEGRASE INT1 NAS AMOSTRAS DO SOLO 1 E SOLO 2

Nas amostras de S1, houve correlação moderada do gene RNAr 16S com ao gene *blaTEM* (0.54), além correlação forte da integrase *int1* com os genes *ermB*, *sul1* e *tetA* (0.71, 0.88 e 0.74 respectivamente), representados na Figura 13. A correlação entre o gene *blaTEM* e bactérias totais pode estar associado ao resistoma natural do solo. Kampouris *et al.*(2021) corroboraram o fato de que os genes *blaTEM* e *bla_{CTX--M-32}* são membros estáveis do resistoma natural do solo, já que não foram afetados com a fertirrigação.

Figura 13- Correlação entre cópias de *int1* e GRAs em log no solo 1



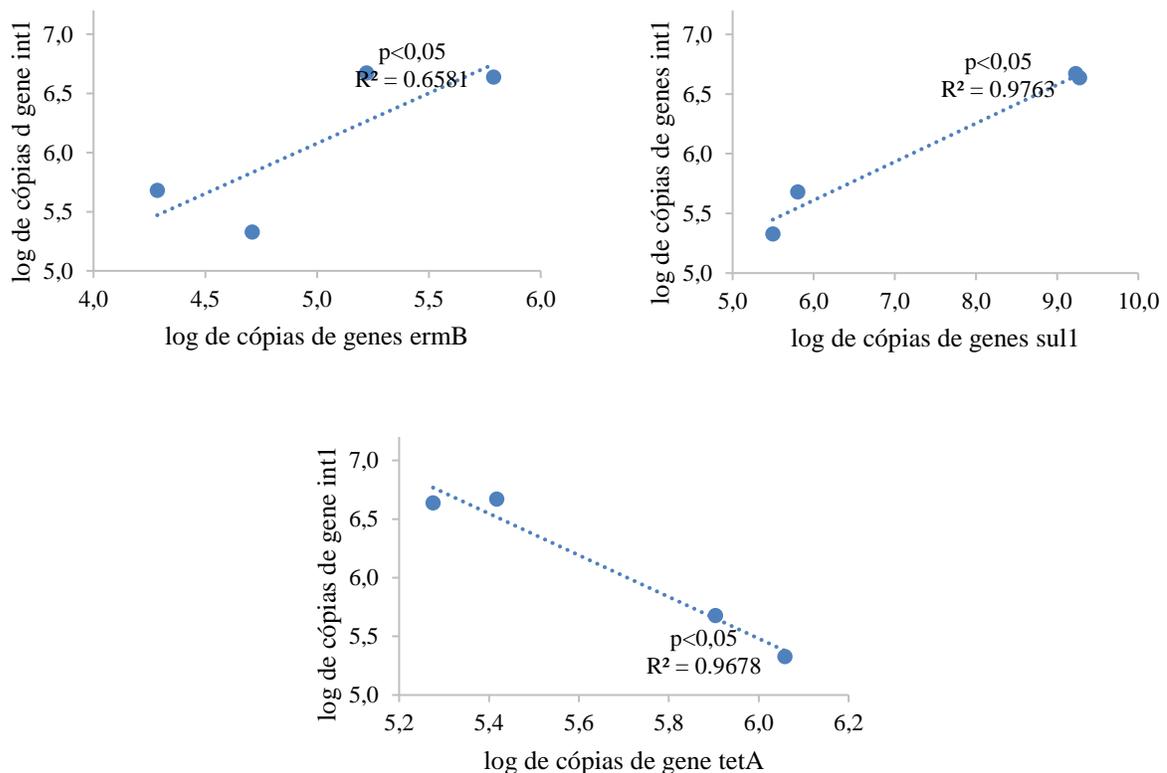
Fonte: a autora

Já no S2 também foi observado correlações positivas entre *int1* com o gene *sul1* e *ermB* (0,79- forte e 0,60 – moderada, respectivamente), além de correlação forte e negativa quanto ao *int1* e *tetA* (-0,72), apresentadas na Figura 14: Em adição, foram observadas correlações negativas

e fracas entre o gene *blaTEM* e a integrase *int1* nas duas amostras de solo (-0,48 no solo 1 e -0,59, $p < 0,05$).

Como a integrase *int1* corresponde a um indicador potencial de transferência horizontal de genes *ermB* e *sul1* (Wang, 2014), é provável que este elemento móvel esteja envolvido disseminação desses genes nas duas áreas de solo amostradas. Khan *et al* (2013) também encontraram altos níveis de *sul1* e *int1*, indicando correlação forte com ambientes contaminados por antimicrobianos. Através de uma análise multifásica, Kampouris *et al* (2021) concluíram que genes *sul1* e *int1* (além dos genes *qnrS* e *bla_{OXA-58}*), foram aumentados pela irrigação com efluente tratado.

Figura 14- Correlação entre cópias de *int1* e GRAs em log no solo 2



Fonte: a autora

Um estudo anterior, realizado com amostras de solos prístinos na Antártica também verificou a existência de 177 genes que conferem resistência a antimicrobianos naturais, contudo, não foram encontrados elementos genéticos móveis, como integrons, transposons e recombinases. A resistência parece ter se dado através de transferência vertical (de geração em geração das bactérias) e não horizontal (VAN GOETHEM *et al.*, 2018).

É importante destacar que em estudo recente também em solos prístinos intocados no Tibete, região do planalto da Ásia, foram encontrados EGM, em que o integron *int1* foi o mais abundante, levando ao entendimento de que tais elementos não são exclusivos de ambientes antropizados (LI *et al*, 2020).

Concluindo, a presença de genes de resistência a antibióticos sintéticos como os que conferem resistência às sulfonamidas (*sul1*) e fluoronoquinolonas (*qnrB*) assim com a presença do elemento genético móvel *int1* pode indicar a ocorrência de transferência horizontal desses genes entre as bactérias do solo, hipótese preocupante, já que bactérias poderiam replicar o gene e transferir a outras bactérias do ambiente bem como bactérias patogênicas, levando a um problema de saúde pública. Não foi possível analisar correlações das amostras de açude, devido ao número pequeno de amostras (n=2) e não foram observadas correlações entre genes nas amostras do efluente tratado (n=4).

5.3.2 CORRELAÇÃO ENTRE ELEMENTOS GENÉTICOS DE RESISTÊNCIA E PARÂMETROS COT, NT, PH E GRANULOMETRIA NAS AMOSTRAS DO SOLO 1 E SOLO 2

Não foram observadas correlações entre os elementos genéticos de resistência -EGR e os parâmetros COT, NT e pH (n=20, p<0,05) entre as amostras do solo 1, o que pode significar que a quantidade de carbono, nitrogênio e a variação do pH não interferiram na quantificação dos GRAs investigados no S1. Já no S2, o pH das amostras de S2 foi correlacionado com todos os genes estudados (n=20), destacando-se a correlação positiva forte com os genes *ermB*, *sul1* e o gene *int1* (0,72, 0,75 e 0,72); além ser também observada correlação moderada entre o gene RNAr 16s e COT, indicando uma possível relação entre as bactérias totais e matéria orgânica do solo 2. Dessa forma, os genes *ermB*, *sul1* e o gene *int1* parecem estar mais relacionados ao pH mais alcalino do solo.

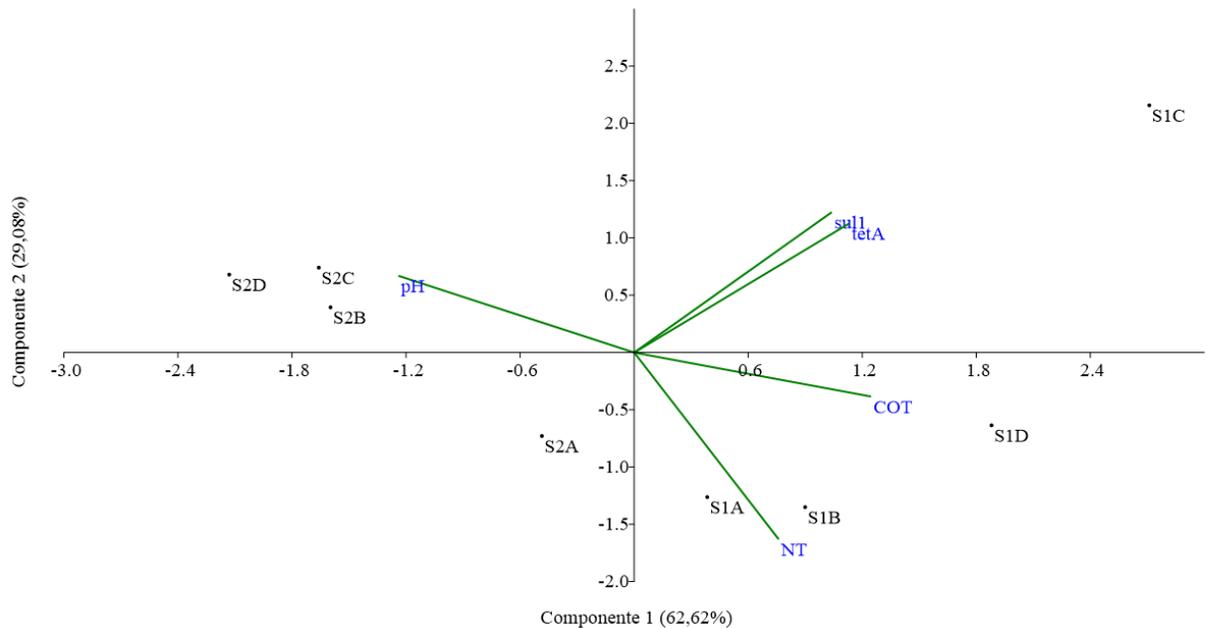
O solo 1 que contém maior teor de argila, na teoria seria mais propício às interações com bactérias do que o solo 2, tendendo a ter uma maior quantificação de bactérias. Todavia, a média dos dois solos em relação às bactérias totais e aos somatórios de GRAs foram bem próximos nas duas amostras (solo 1: 9.3 ± 0.17 e 8.6 ± 1.53 e solo 2: 9.23 ± 0.40 e $8.06 \pm 1.21 \log_{10}$ do número de cópias do gene RNAr 16S e cópias de GRAs/g de solo) levando à conclusão de que a granulometria do solo parece não ter interferido na quantificação de bactérias e GRAs. Quanto ao efluente tratado, também não foram encontradas correlações entre os genes e o pH, COT e NT.

Em resumo, não foi possível perceber um padrão de correlação entre o teor de matéria orgânica no efluente tratado e no solo 1 que recebeu esse efluente tratado nas coletas realizadas, e apesar da provável contribuição da acidez do solo através da fertirrigação e da contribuição do efluente tratado para o aumento de carbono orgânico total e nitrogênio, esses parâmetros em primeira análise parecem não estar envolvidos diretamente na quantificação de GRAs através da fertirrigação no solo.

5.4 ANÁLISE DAS COMPONENTES PRINCIPAIS

A (ACP) Análise das Componentes Principais foi utilizada com intuito compreender como o período de amostragem influenciou na dispersão dos genes *sulI* e *tetA* no solo 1 e solo 2 e a disposição dos mesmos parâmetros na amostragem dos solos. A Figura 15 apresenta a análise das médias das amostras de solo 1 e solo 2, em que as componentes 1 e 2 juntas explicaram 91,7% das variâncias observadas para as abundâncias absolutas dos genes e os parâmetros físico-químicos relacionados às quatro coletas de solo.

Figura 15- Análise das componentes principais por local de coleta e períodos de amostragem de solo



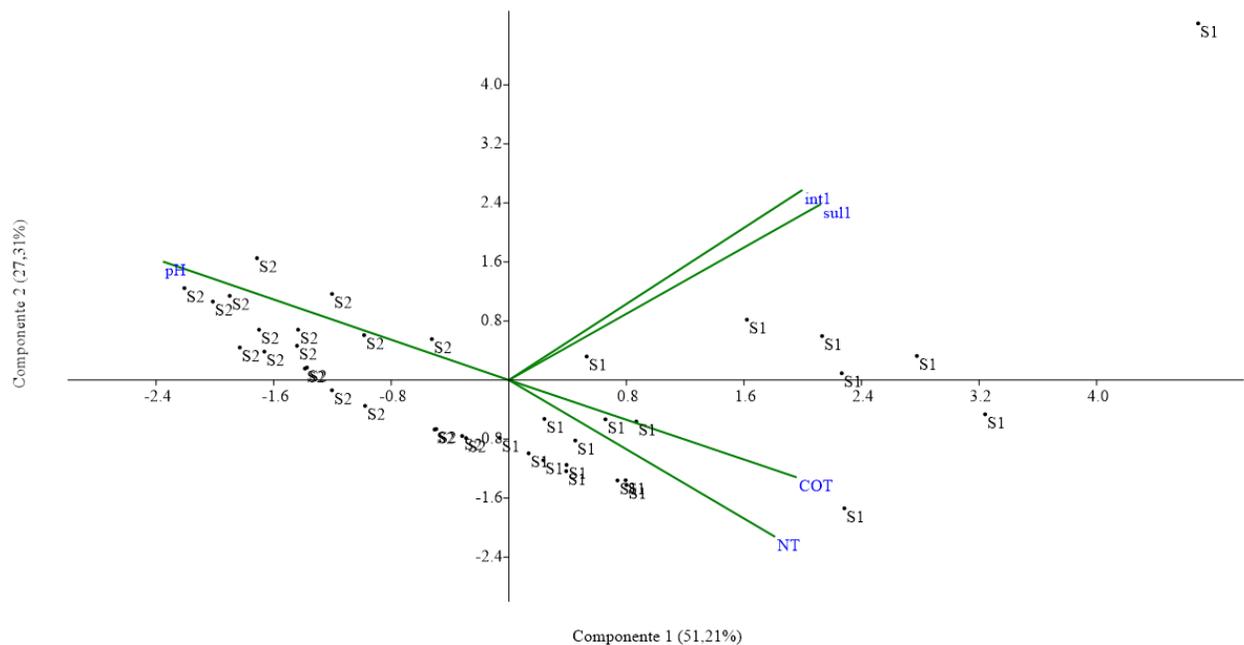
Fonte: a autora. Solo 1: S1A, S1B, S1C, S1D e solo 2: S2A, S2B, S2C e S2D, as letras após as siglas S1 e S2 correspondem às coletas amostradas -A, B, C e D: coleta 1, coleta 2, coleta 3 e coleta 4 respectivamente.

As variáveis *sull*, *tetA* foram as mais representativas para as Componentes 1 e 2, e COT foi o parâmetro físico-químico mais representativo para Componente 1, enquanto o pH foi o mais representativo para Componente 2. O agrupamento da maioria dos pontos de coleta do S1 do lado direito e do S2 à esquerda pode indicar uma diferença entre as duas amostras de solo (solo 1 e solo 2). Os genes *sull*, *tetA*, COT parecem estar mais relacionados à coletas 3 solo 1.

As amostras e S2B, S2C e S2D (coleta 2, coleta 3 e coleta 4 do solo 2), à esquerda do gráfico, indica que estas apresentaram maiores valores de pH, o que pode ser comprovado nos dados referentes à essas coletas (Figura 4). Adicionalmente, os parâmetros COT e NT parecem estar mais relacionados às coletas 1, 2 e 4, o que corrobora mais uma vez os resultados obtidos das concentrações desses parâmetros, em que o solo 1 havia uma maior concentração desses parâmetros.

Na Figura 16 é possível visualizar a ACP com dados de todas as amostras de solo, separadas apenas pelo local de amostragem (S1 – fertirrigado e S2- não fertirrigado diretamente), em que se observa configuração parecida das amostras. As componentes 1 e 2 explicaram juntas 78,51% das variâncias observadas.

Figura 26: Análise das componentes principais nas amostragens de solo



Fonte: a autora.

5.5 ANÁLISE DO ISOLAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES A NORFLOXACINA

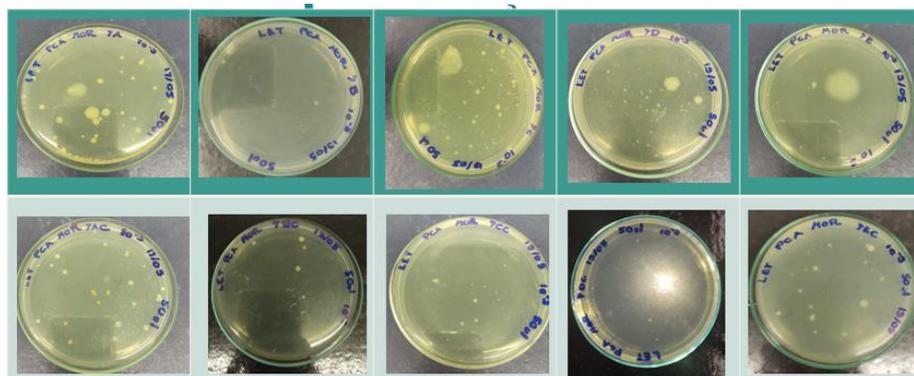
A quantificação absoluta em termos de UFC (unidades formadoras de colônia) foi de $3,1 \times 10^3$ em no S1 e $7,8 \times 10^2$ UFC/ g de solo no S2 (Figura 17). De uma forma geral foi possível observar que o solo fertirrigado tem quatro vezes mais BRN do que o solo que não recebeu fertirrigação direta ($p < 0,05$) sugerindo um efeito direto da fertirrigação na contagem de BRN.

Negreanu *et al* (2012) encontrou um valor superior de UFC, variando de 1 e 3×10^6 UFC / g solo na investigação da abundância de cepas bacterianas resistentes a tetraciclina, ciproflaxina e eritromicina entre amostras de solo fertirrigada e amostras irrigadas com água potável. Contudo, a abundância relativa de bactérias resistentes a antibióticos não foi maior nas amostras de solo fertirrigado e não houve correlação entre o efluente tratado e a resistência antimicrobiana no solo, mesmo comparando solos com maiores teores de argilas com solos mais arenosos. Curiosamente, neste estudo um gene também referente a resistência à fluoronoquinolona (*qnrA*) também esteve abaixo do limite de detecção das amostras analisadas (NEGREANU *et al*, 2012).

A diferença da quantificação das BRN no S1 e S2 pode também estar relacionada à biodegradação do antibiótico, dependendo diretamente da atividade microbiana em cada solo - muito importante na degradação desse composto, além de outros fatores, como a concentração do antibiótico, umidade e nutrientes presentes no solo (YANG *et al*, 2012).

Infelizmente a quantificação relativa, considerando a quantificação de bactérias totais, não será apresentada uma vez que não foi possível isolar colônias devido ao excessivo crescimento fúngico (Figura 17), que impedia a análise das colônias, mesmo nas diluições mais altas.

Figura 17- Colônias de bactérias nas amostras de solo

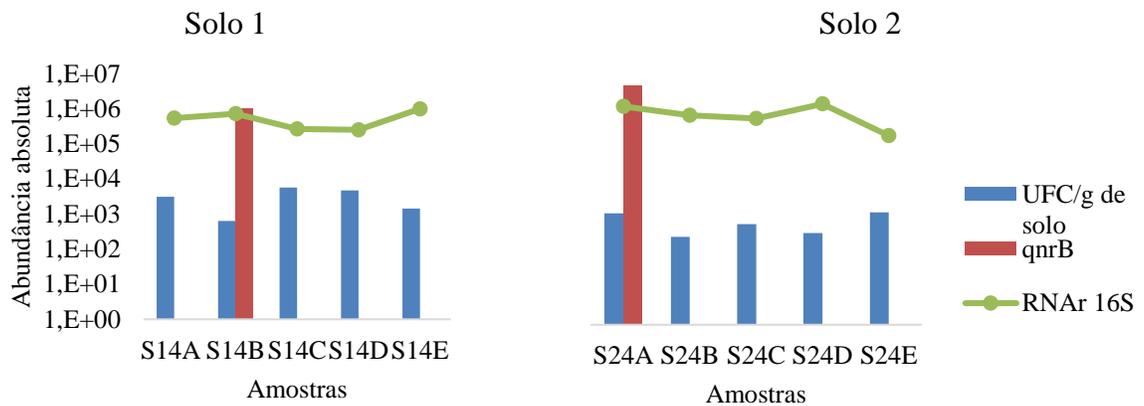


Fonte: a autora.

Em análises de solo em outros estudos já foi verificado que o antibiótico norfloxacino mostrou grande afinidade com partículas de solo, todavia, foi observado uma imobilidade desse antibiótico nos solos avaliados (PERUCHI *et al.*, 2015). É válido ressaltar que a norfloxacina adsorvida por planta pode ser mais recalcitrante que o solo, levando à um possível risco de dissipação do antibiótico do solo para plantas cultiváveis, como o caso da plantação de milho no presente estudo (WANG *et al.*, 2016).

Como a maior parte da quantificação do gene *qnrB* que confere resistência à classe de antibióticos fluoroquinolonas (Figura 18) estava abaixo do limite de detecção nas amostras, não foi possível averiguar ligação entre a presença desse antibiótico e o aumento da resistência ao gene *qnrB*.

Figura 18: Abundância absoluta de UFC em cada amostras de solo da quarta coleta



Fonte: a autora. Os códigos S14A a S14E referem-se às amostras do solo 1 (fertirrigado) e S24A a S24E às amostras do solo 2 (não irrigado diretamente). Somente as amostras S14B e S24C da quarta coleta apresentaram n° de cópias de gene acima do limite de detecção (8.00E+5 cópias/g de amostras em reação).

Quanto à formação de UFC, unidades formadoras de colônia, na presença do antibiótico norfloxacina, observou-se um aumento significativo de isolados no solo fertirrigado (S1) quando comparado ao não fertirrigado (S2). Como o gene *qnrB* foi detectado pelo método analítico em apenas uma amostra (de cinco replicatas) no solo 1 e no solo 2 (amostras S14B e S24C), não foi possível perceber uma relação entre o antibiótico norfloxacina e esse gene em específico, contudo, estudos com os demais genes de resistência ligados ao grupo das fluoroquinolonas podem auxiliar na compreensão da resistência à norfloxacina no solo nessa área de estudo.

6.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todos os genes investigados (*ermB*, *tetA*, *sul1*, *int1*, *qnrB*, *blaTEM*) e o elemento genético móvel *int1* foram detectados em todas as campanhas no S1, S2, A e ET. O gene *sul1* foi o mais abundante entre as amostras, com exceção das amostras do açude em que prevaleceram maior abundância do gene *blaTEM*, atuando no meio como possível sumidouro de GRAs.

Genes *sul1* e *tetA* foram mais abundantes estatisticamente no solo fertirrigado do que no solo não fertirrigado, quando a análise estatística foi realizada com todas as replicatas de todas coletas. Ao analisar cada coleta separadamente, percebeu-se um padrão diferente quanto aos genes *tetA* e *ermB*, em que a abundância absoluta do gene *ermB* foi maior no solo fertirrigado nas coletas 1, 2 e 3 e de *tetA* foi maior apenas nas coletas 3 e 4, além da integrase *int1*, que esteve em maior quantificação nas coletas 1, 2 e 4 nessas amostras. O gene *sul1* foi estatisticamente maior no solo fertirrigado do que no solo não fertirrigado em todas as coletas. Como o mesmo gene estava presente no efluente tratado, é possível que a fertirrigação esteja contribuindo para o aumento desse gene no solo e a integrase *int1* pode estar envolvida nesse processo de disseminação do gene no ambiente.

Foi possível perceber um decaimento de GRAs de até um 1 log₁₀ de número de cópias entre o solo fertirrigado e solo não fertirrigado, contudo, não houve diferença estatística dos dados relativos dos GRAs ao comparar as amostras de solo, que aparentemente se assemelhou muito nas duas amostras de solo.

Em adição, notou-se correlação entre o gene *int1* e os genes *ermB* e *sul1*, indicando que a integrase 1 provavelmente esteja envolvida na disseminação desses genes nas duas áreas de solo amostradas. Não foi possível perceber um padrão de correlação entre o teor de matéria orgânica no efluente tratado e no solo fertirrigado nas coletas realizadas, e apesar da provável contribuição da acidez do solo através da fertirrigação e da contribuição do efluente tratado para o aumento de carbono orgânico total e nitrogênio, esses parâmetros em primeira análise parece, não estar envolvidos diretamente na quantificação de GRAs através da fertirrigação no solo.

O gene *qnrB* esteve abaixo do limite de detecção do método analítico no solo não fertirrigado na coleta 1, na maior parte das coletas 3 e 4 neste solo e no solo fertirrigado. Não foi possível perceber uma relação entre o antibiótico norfloxacina e esse gene em específico, apesar de ter sido observado um aumento significativo de isolados resistentes ao antibiótico norfloxacina no solo fertirrigado quando comparado ao não fertirrigado. Contudo, estudos com os demais genes

de resistência ligados ao grupo das fluoroquinolonas podem auxiliar na compreensão da resistência à norfloxacin no solo nessa área de estudo.

Mais campanhas amostrais tornam-se necessárias para possibilitar a compreensão do impacto da fertirrigação do solo na variação dos níveis de resistência a antibióticos, assim como a análise de bactérias resistentes a antibióticos para investigação do potencial de transferência de GRAs à saúde humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL – ABPA. **Relatório anual 2020**. Disponível em: https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2020/05/abpa_relatorio_anual_2020_portugues_web.pdf. Acesso em 03 de dez de 2020.

__ **Desenvolvimento e emprego na avicultura e suinocultura no Brasil**. Disponível em: <https://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/comissoes/comissoes-permanentes/capadr/apresentacoes-em-eventos/eventos-de-2021/audiencia-publica-21-de-junho-de-2021-abpa/view>. Acesso em 02 de set de 2021.

AGERSØ, Y. & SANDVANG, D. **Class 1 integrons and tetracycline resistance genes in *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, and *Pseudomonas* spp. isolated from pigsties and manured soil**. Appl. Environ. Microbiol. 71, 7941–7947 (2005).

AGNE, S.A.A. KLEIN, V.A. **Matéria orgânica e atributos físicos de um Latossolo Vermelho após aplicações de dejetos de suínos**. Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental, Campina Grande, v. 18, n. 7. p. 720-726, 2014.

ALBERNAZ-GONÇALVES, Rita; OLMOS, Gabriela; HÖTZEL, MARIA José. **Exploring Farmers' Reasons for Antibiotic Use and Misuse in Pig Farms in Brazil**. Antibiotics, v. 10, n. 3, p. 331, 2021.

ALDEMA ML, MCMURRY LM, WALMSLEY AR, LEVY SB. **Purification of the Tn10-specified tetracycline efflux antiporter TetA in a native state as a polyhistidine fusion protein**. Mol Microbiol. 1996 Jan;19(1):187-95. doi: 10.1046/j.1365-2958.1996.359886.x. PMID: 8821947.

ALDRED, K.J., KERNS, R.J., OSHEROFF, N. (2014). **Mechanism of quinolone action and resistance**. Biochemistry. v.18, p.1565-1574

ALLEN, H. K. (2014). **Antibiotic resistance gene discovery in food-producing animals**. Current Opinion in Microbiology, 19, 25-29.

ALMEIDA, E.P.C; SANTOS, H.G; ZARONI, M.J. Latossolos Vermelho-Amarelos. **Árvore do conhecimento:solos tropicais**. EMBRAPA. Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/solos_tropicais/arvore/CONT000g05ip3qr02wx5ok0q43a0r3t5vjo4.html. Acesso em 20 de out de 2021.

Andrade, L. N., Leite, M. G. P., & Bacellar, L. D. A. P. (2012). **Composição mineralógica e geoquímica dos solos do parque estadual do Itacolomi-Ouro Preto/MG**. Quaternary and Environmental Geosciences, 3(1-2).

ANDRADE, L. N; DARINI, A. L. C (2020). **Mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos**. Curso Básico de Antimicrobianos Divisão de MI – CM – FMRP-USP

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA (2018). **Limites Máximos de Resíduos de Medicamentos Veterinário sem Alimentos de Origem Animal**. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/219201/219401/Med+Vet_Documento+base+discussa~o+18.10/69d161b5-785c-4907-862c-2294b48a79c5. Acesso em 04 de jul de 2021.

ARANTES, Felipe Rocha. **Água residuária de suinocultura: uma revisão bibliográfica** (2020).

ARAÚJO, S.F. **Biodegradação, extração e análise de glifosato em dois tipos de solos**. Piracicaba, (2002). Dissertação (mestrado). Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11138/tde-05092002-161341/publico/ademir.pdf>. Acesso em 18 de out de 2019.

ARAÚJO, 2020. Célia M. Manaia, Erica Donner, Ivone Vaz-Moreira, and Peiyong Hong (eds.), **Antibiotic Resistance in the Environment: A Worldwide Overview**, Hdb Env Chem (2020) 91: 189–216, DOI 10.1007/698_2020_470, © Springer Nature Switzerland AG 2020, Published online: 25 March 2020.

ARIAS M. V. B; C. CARRILHO, M. D. M (2012). **Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação?** Disponível em: <http://www.uel.br/seer/index.php/semagrarias/article/viewFile/7753/10478>. Acesso em 27 de mai de 2020. DOI: 10.5433/1679-0359.2012v33n2p775

ARSAND, JB, HOFF, RB, JANK, L., BUSSAMARA, R., DALLEGRAVE, A., BENTO, FM, ... & PIZZOLATO, TM (2020). **Presença de genes de resistência a antibióticos e sua associação com a ocorrência de antibióticos no rio Dilúvio, sul do Brasil**. Science of The Total Environment , 738 , 139781.

BAHIA. **Resolução nº. 75, de 29 de julho de 2010**. Estabelece procedimentos para disciplinar a prática de reúso direto não potável de água na modalidade agrícola e/ou florestal. Disponível em: [chrome-extension://efaidnbnmnnibpcajpcglclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=http%3A%2F%2Fwww.seia.ba.gov.br%2Fsites%2Fdefault%2Ffiles%2Flegislation%2FRESOLU%25C3%2587%25C3%2583O%2520n%25C2%25BA%252075.pdf&cLen=26682&chunk=true](http://www.seia.ba.gov.br/sites/default/files/Flegislation/FRESOLU%25C3%2587%25C3%2583O%2520n%25C2%25BA%252075.pdf&cLen=26682&chunk=true). Acesso em 21 de jan de 2022.

N, W., WANG, J., PAN, X., & QIANG, Z. (2017). **Dissemination of antibiotic resistance genes and their potential removal by on-farm treatment processes in nine swine feedlots in Shandong Province, China**. Chemosphere, 167, 262-268.

BETTIOL, W., CAMARGO, O. A. **Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto**. Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna, SP). 2000.

BIBLIOMED. **Norfloxacin**. Disponível em: bibliomed.com.br/lib/showdoc.cfm?LibDocID=17250&ReturnCatID=0&titulo=norfloxacin.html. Acesso em 14 de set de 2021.

BIEDENBACH, D.J., MOET, G.J., JONES, R.N. (2004). **Ocurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infections isolate from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program.** *Diagn Microbiol Infect Dis*, v.50, p.59-69

BINH, C. T. T. et al. **Piggery manure used for soil fertilization is a reservoir for transferable antibiotic resistance plasmids.** *out. 2008, [S.l: s.n.], out. 2008. p. 25–37.*

BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL. **BNDES Setorial 45(2017).** Disponível em: <https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/handle/1408/11734>. Acesso em: 12 de out de 2021.

BOSCO, T. C. D.; COSMANN, N. J.; SBIZZARO, M.; TAIATELE JUNIOR, I.; SILVA, J. dos S. **Caracterização de águas residuárias de suinocultura provenientes de dois sistemas de tratamento.** *Revista Agrogeoambiental, Pouso Alegre*, v. 8, n. 3, p. 111-120, Set. 2016

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos no âmbito da saúde única 2018-2022 (PAN-BR)** [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2019.

BRITO, L.L.A; CORDEIRO, P.H.M; CORDEIRO, H.G. **Panorama do tratamento de efluentes de suinocultura em Minas Gerais: tecnologias aplicadas e potencial de aproveitamento energético** (2017). Congresso ABES FENASAN 2017. II – 347. Disponível em: <https://www.tratamentodeagua.com.br/artigo/tratamento-efluentes-suinocultura/> Acesso em 07 de mai de 2020.

CADONÁ, Eliana Aparecida. **Contaminação da água pelo uso de agrícola de dejetos de suínos na bacia hidrográfica rio Coruja/Bonito, Braço Norte/SC.** 2017.119. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós graduação em Agroecossistemas, Universidade Federal de Santa Catarina.

CARD. **The Comprehensive Antibiotic Resistance Database.** Disponível em: <https://card.mcmaster.ca/home>. Acesso em 23 de mar de 2021.

CARVALHAIS, Alexandra Raquel Morais da Costa. **Caraterização de genes de resistência a antibióticos em isolados de Enterobacteriaceae provenientes de suinoculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal.** Dissertação apresentada à Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal. Disponível em: https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/5311/1/PPG_19849.pdf. Acesso em 24 de ago de 2021.

CARVALHO FILHO, Amaury de; CURI, Nilton; SHINZATO, Edgar. **Relações solo-paisagem no Quadrilátero Ferrífero em Minas Gerais.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 45, p. 903-916, 2010

CEARÁ. Lei Nº 16033 DE 20/06/2016. **Dispõe sobre a política de reúso de água não potável no âmbito do Estado do Ceará.** Disponível em: <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=325190>. Acesso em 14 de dez de 2021.
CECCATO, V.M (2015) . **Biologia molecular**. 2. ed. Fortaleza: EDUECE, 2015.

CONSELHO ESTADUAL DE RECURSOS HÍDRICOS- CNRH (Minas Gerais). **Deliberação Normativa CERH-MG nº 65, de 18 de junho de 2020.** Estabelece diretrizes, modalidades e procedimentos para o reúso direto de água não potável, proveniente de Estações de Tratamento de Esgotos Sanitários (ETE) de sistemas públicos e privados e dá outras providências. Disponível em : <http://www.siam.mg.gov.br/sla/download.pdf?idNorma=52040>. Acesso em 02 de jun de 2021

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. **Saúde única.** Disponível em: <https://www.cfmv.gov.br/saude-unica/comunicacao/2018/10/09/>. Acesso em: 04 de jul de 2021.
Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA (Brasil). Resolução nº375 de 29 de ago de 2006. Define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, e dá outras providências.. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/res/res06/res37506.pdf>. Acesso em 20 de nov de 2019.

CHEN, L. F.; CHOPRA, T.; KAYE, K. S. **Pathogens Resistant to Antibacterial Agents.** Medical Clinics of North America, v. 95, n. 4, p. 647-676 2011.

CHEN, H., & ZHANG, M. (2013). **Occurrence and removal of antibiotic resistance genes in municipal wastewater and rural domestic sewage treatment systems in eastern China.** *Environment international*, 55, 9-14.

CONSELHO NACIONAL DE RECURSOS HÍDRICOS-CNRH (Brasil). **Resolução nº121de 16 de dezembro de 2010.** Estabelece diretrizes e critérios para a prática de reúso direto não potável de água na modalidade agrícola e florestal. Disponível em: <https://www.ceivap.org.br/ligislacao/Resolucoes-CNRH/Resolucao-CNRH%20121.pdf>. Acesso em 01 de set de 2021.

__**Resolução nº 54 de novembro de 2005.** Estabelece modalidades, diretrizes e critérios gerais para a prática de reúso direto não potável de água, e dá outras providências. Disponível em: <https://www.ceivap.org.br/ligislacao/Resolucoes-CNRH/Resolucao-CNRH%2054.pdf>. Acesso em : 01 de set de 2021.

COELHO, A. M., DE FRANÇA, G. E., PITTA, G. V. E., ALVES, V. M. C., & HERNANI, L. C. (2008). **Fertilidade de solos: nutrição e adubação do milho.** Embrapa Milho e Sorgo-Capítulo em livro científico (ALICE).

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE- CONAMA(2020). **Resolução nº 498, de 19 de agosto de 2020.** Ministério do Meio Ambiente/Conselho Nacional do Meio Ambiente. Define critérios e procedimentos para produção e aplicação de biossólido em solos, e dá outras providências. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-n-498-de-19-de-agosto-de-2020-273467970>. Acesso em 21 de jul de 2021.

__**Resolução nº 430, de 13 de mai de 2011.** Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAM. Disponível em: <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=114770> . Acesso em 01 de set de 2021

CHEN Z, ZHANG W, WANG G, ZHANG Y, GAO Y, BOYD SA, TEPPEN BJ, TIEDJE JM, ZHU D, LI H (2017) **Bioavailability of soil-sorbed tetracycline to Escherichia coli under unsaturated conditions.** Environ Sci Technol 51:6165–6173.

CONSELHO ESTADUAL DE POLÍTICA AMBIENTAL – COPAM.**Deliberação Normativa Conjunta COPAM/CERH-MG nº 01, de 05 de maio de 2008.** Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.Acesso em 14 de jun de 2021.

CZEKALSKI, N., SIGDEL, R., BIRTEL, J., MATTHEWS, B., & BÜRGMANN, H. (2015). **Does human activity impact the natural antibiotic resistance background? Abundance of antibiotic resistance genes in 21 Swiss lakes.** Environment international, 81, 45-55.

DA SILVA, J. B., DOS SANTOS WEBER, O. L., VIEIRA, C. R., & DA SILVA, J. B. (2018). **Alterações nos Atributos Químicos de um Latossolo fertirrigado com efluentes da Atividade Suinícola.** Revista de Ciências Agroambientais, 16(2), 103-107.

DA SILVA, J. M. B., & HOLLENBACH, C. B. (2020). **Fluoroquinolonas x Resistência bacteriana na medicina veterinária.** Arquivos do Instituto Biológico, 77, 363-369.

DONG, P., WANG, H., FANG, T., WANG, Y., & YE, Q. (2019). **Assessment of extracellular antibiotic resistance genes (eARGs) in typical environmental samples and the transforming ability of e ARG.** Environment international, 125, 90-96.

DUARTE, Karina Ferreira. **Panorama do uso de antibióticos na nutrição animal. Nutrição e Saúde Animal.** <https://nutricaoesaudeanimal.com.br/uso-de-antibioticos-na-nutricao-animal/>. Acesso em 13 de mai de 2021.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Propriedades do solo - Portal Embrapa** (1979). Disponível em: <https://www.embrapa.br/solos/sibcs/propriedades-do-solo>. Acesso em 03 de ago de 2021.

__**Manual de procedimentos de coleta de amostras em áreas agrícolas para análise da qualidade ambiental: solo, água e sedimentos (2006)** / editado por Heloisa Ferreira Filizola, Marcos Antonio Ferreira Gomes e Manoel Dornelas de Souza. - Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/129660/1/2006OL-008.pdf>. Acesso em 04 de jul de 2021.

__EMBRAPA Suínos E Aves **Desempenho da produção** (2021). Disponível em: <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas>. Acesso em 02 de set de 2021.

__**Origem da acidez** (2021). Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/soja/arvore/CONTAG01_34_271020069132.html#:~:text=Os%20solos%20podem%20ser%20naturalmente,solo%20e%2C%20consequentemente%2C%20tamb%C3%A9m%20na. Acesso em 06 de setembro de 2021.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA -EMBRAPA (2017)a. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de métodos de análise de solo** / Centro Nacional de Pesquisa de Solos. – 3. ed. rev. atual. – Brasília, DF.

FERREIRA. F. L., RESENDE, J.S.A **cultura do milho**. Disponível em: <https://www.emater.mg.gov.br/doc/site/serevicooseprodutos/livraria/Culturas/Cultura%20do%20Milho.pdf>. Acesso em 08 de ago de 2021.

FERRIS, M. J.; MUYZER, G.; WARD, D. M. **Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community**. Appl. Environ. Microbiol., v. 62, n. 2, p. 340-346, 1996.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-Producing Animals**. FDA 2019. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/144427/download>. Acesso em : 11 de set de 2021.

GAO, H., ZHANG, L., LU, Z., HE, C., LI, Q., NA, G., 2018. **Complex migration of antibiotic resistance in natural aquatic environments**. Environ. Pollut. 232, 1–9

GILLINGS MR. **Integrans: past, present, and future**. Microbiol Mol Biol Rev. 2014 Jun;78(2):257-77. doi: 10.1128/MMBR.00056-13. PMID: 24847022; PMCID: PMC4054258.

GILLINGS, M., GAZE, W., PRUDEN, A. et al. **Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution**. ISME J 9, 1269–1279 (2015). <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.226>

GOLDSTEIN, C.; LEE, M. D.; SANCHEZ, S.; HUDSON, C.; PHILLIPS, B.; REGISTER, B.; GRADY, M.; LIEBERT, C.; SUMMERS, A. O.; WHITE, D. G.; MAURER, J. J. **Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 45, n. 3, p. 723-726, 2001
GU, Y., SHEN, S., HAN, B., TIAN, X., YANG, F., & ZHANG, K. (2020). **Family livestock waste: an ignored pollutant resource of antibiotic resistance genes**. Ecotoxicology and environmental safety, 197, 110567.

GUBANI, P.I.; REINERT, D. J.; REICHERT, J.M.; CERETTA, C.A.; KUNZ, M. **Condições físicas de um Argissolo Vermelho Distrófico arênico após oito ciclos de cultivo e uso de dejetos de suínos**. Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, (XXXI CBCS), Gramado (RS), 2007

- HAN, X. M., HU, H. W., SHI, X. Z., WANG, J. T., HAN, L. L., CHEN, D., & HE, J. Z. (2016). **Impacts of reclaimed water irrigation on soil antibiotic resistance in urban parks of Victoria, Australia.** *Environmental pollution*, 211, 48-57.
- HEUER, H.; SOLEHATI, Q.; ZIMMERLING, U.; KLEINEIDAM, K.; SCHLOTTER, M.; MÜLLER, T.; FOCKS, A.; THIELE-BRUHN, S.; SMALLA, K. **Accumulation of sulfonamide resistance genes in arable soils due to repeated application of manure containing sulfadiazine.** *American Society for Microbiology* (2011), doi 10.1128/AEM.02577-10. Disponível em : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3067416/>. Acesso em 02 de nov de 2019.
- HOFF, Rodrigo (2008). **Análise de resíduos de sulfonamidas em alimentos por eletroforese capilar e espectrometria de massas.** Dissertação submetida à Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/15825/000691462.pdf>. Acesso em 24 de ago de 2021.
- HUANG, H., CHEN, Y., ZHENG, X., SU, Y., WAN, R., & YANG, S. (2016). **Distribution of tetracycline resistance genes in anaerobic treatment of waste sludge: The role of pH in regulating tetracycline resistant bacteria and horizontal gene transfer.** *Bioresource technology*, 218, 1284-1289.
- KAMPOURIS, I. D., AGRAWAL, S., ORSCHLER, L., CACACE, D., KUNZE, S., BERENDONK, T. U., & KLÜMPER, U. (2021). **Antibiotic resistance gene load and irrigation intensity determine the impact of wastewater irrigation on antimicrobial resistance in the soil microbiome.** *Water Research*, 193, 116818.
- KHAN, G. A., BERGLUND, B., KHAN, K. M., LINDGREN, P. E., & FICK, J. (2013). **Occurrence and abundance of antibiotics and resistance genes in rivers, canal and near drug formulation facilities—a study in Pakistan.** *PloS one*, 8(6), e62712.
- KIEHL, E. J. **Compostagem: maturação e qualidade do composto.** In: ENCONTRO NACIONAL DE LIMPEZA PÚBLICA ,1998, São Paulo. A n ais... São Paulo: ABLP, 1998. p. 96-104.
- KUNZ, Airton; HIGARASHI, Martha Mayumi; DE OLIVEIRA, Paulo Armando. **Tecnologias de manejo e tratamento de dejetos de suínos estudadas no Brasil.** *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, v. 22, n. 3, p. 651-665, 2005.
- KURWADKAR, S. T., ADAMS, C. D., MEYER, M. T., & KOLPIN, D. W. (2007). **Effects of sorbate speciation on sorption of selected sulfonamides in three loamy soils.** *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(4), 1370-1376.
- LECLERCQ, Roland . **Mecanismos de resistência a macrolídeos e lincosamidas: natureza dos elementos de resistência e suas implicações clínicas** , *Doenças Infecciosas Clínicas* , Volume 34, Edição 4, 15 de fevereiro de 2002, Páginas 482-492, <https://doi.org/10.1086/324626>
- LEMOES, R. D., & SANTOS, R. D. (1996). **Manual de descrição e coleta de solo no campo** (Vol. 84). Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo.

LI, B., CHEN, Z., ZHANG, F., LIU, Y., & YAN, T. (2020). **Abundance, diversity and mobility potential of antibiotic resistance genes in pristine Tibetan Plateau soil as revealed by soil metagenomics.** FEMS Microbiology Ecology, 96(10), fiae172.

LINHARES, L. A., EGREJA FILHO, F. B., DE BELLIS, V. M., DOS SANTOS, E. A., & IANHEZ, R. (2010). **Langmuir and Freundlich models applied to copper and zinc adsorption in Brazilian soils.** Acta Agronômica, 59(3), 303-315.

LOFFLIN, J. ,2005. **The antibiotic revolution.** Veterinary Medicine 100, 12-19.

LOOF, T.; JOHSON, T.A.; ALLEN, H.K.. **In-Feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.109, n.5, p. 1691-1696, 2012.

LUBY E.M , MOORMAN TB, SOUPIR ML. **Fate and transport of tylosin-resistant bacteria and macrolide resistance genes in artificially drained agricultural fields receiving swine manure.** Sci Total Environ2016;550:1126–33.

MANUAL MSD- Versão para profissionais da saúde. **Fluoronoquinolonas.** Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt-br/profissional/doen%C3%A7as-infecciosas/bact%C3%A9rias-e-f%C3%A1rmacos-antibacterianos/fluoroquinolonas> . Acesso em 14 de set de 2021.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa Nº 01 de 13 de janeiro de 2020.** Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-1-de-13-de-janeiro-de-2020-239402385#:~:text=1%C2%BA%20devem%20comunicar%20ao%20Minist%C3%A9rio,Par%C3%A1grafo%20%C3%BAnico>. Acesso em 19 de jan de 2021.

__Instrução Normativa Nº 14 de 17 de maio de 2012. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-14-de-17-de-maio-de-2012.pdf/view>

__ Instrução normativa .Nº 45, de 22 de novembro de 2016.Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/22078290/do1-2016-11-30-instrucao-normativa-n-45-de-22-de-novembro-de-2016-22078259. Acesso em 22 de jan de 2022.

__ Suinocultura de baixa emissão de carbono(2016).. Tecnologias de produção mais limpa e aproveitamento econômico dos resíduos da produção de suínos. Disponível em: <https://www.embrapa.br/documents/1355242/0/Biog%C3%A1sFert+-+Suinocultura+de+baixa+emiss%C3%A3o+de+carbono.pdf>. Acesso em 04 de dez de 2020.

__Instrução Normativa Nº 61 de 08 de julho de 2020. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-61-de-8-de-julho-de-2020-266802148>. Acesso em: 20 de jan de 2022.

__Instrução Normativa Nº 01, de 13 de janeiro de 2020. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-1-de-13-de-janeiro-de-2020-239402385>. Acesso em 20 de jan de 2022.

__ Orientações para apresentação de relatório técnico (2020). Aditivos zootécnicos e tecnológicos (adsorventes de micotoxinas e inoculantes de silagem). Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/COD_14_20_1Ed.pdf. 1ª edição. Brasília-DF. Acesso em 03 de jun de 2021.

__Programa de Vigilância e Monitoramento da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Agropecuária(2019-2022). Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/resistencia-aos-antimicrobianos/pan-br-agro/ProgramadeVigilanciaeMonitoramentoAMRFINAL5.pdf>. Acesso em 03 de jun de 2021.

MARCHI, B. Disposição de efluentes de suínos em solo: estudo de caso. p. 64, 2010.

Disponível em: http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/256911/1/Marchi_Bruno_M.pdf>. Acesso em 26 de setembro de 2019.

MARTÍ, S., FERNÁNDEZ-CUENCA, F., PASCUAL, Á., RIBERA, A., RODRÍGUEZ-BAÑO, J., BOU, G., ... & Grupo de Estudio de Infeccion Hospitalaria. (2006). **Prevalencia de los genes tetA y tetB como mecanismo de resistencia a tetraciclina y minociclina en aislamientos clínicos de Acinetobacter baumannii.** Enfermedades infecciosas y microbiología clinica, 24(2), 77-80.

MARTINI, Caroline Lopes . **Caracterização da resistência fenotípica e molecular à penicilina e tetraciclina em amostras de staphylococcus aureus isoladas de mastite bovina** / Caroline Lopes Martini – Lages, 2015.

MENDONÇA, F. C.; MEDEIROS, R. D.; BOTREL, T. A.; FRIZZONE, J. A. **Adubação nitrogenada do milho em um sistema de irrigação por aspersão em linha.** Scientia Agrícola, Piracicaba, v. 56, n. 4, p. 1 - 17, 1999.

MAO, D.; YU, S.; RYSZ, M.; LUO, Y.; YANG, F.; LI, F.; HOU, J.; MU, Q.; ALVAREZ, P. Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in two municipal wastewater treatment plants. Water Research, v. 85, p. 458-466, 2015.

MEZEI, Ana Beatriz Contarelli. **Perfil de resistência a antimicrobianos de amostras de Escherichia coli enteropatogênica atípica.** Dissertação apresentada à USP. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/87/87131/tde-23022018->

164103/publico/AnaBeatrizContarelliMezei_Corrigida_Mestrado_P.pdf. Acesso em 24 de ago de 2021.

MINETTO, Luciane. (2013). Antibióticos Macrolídeos: **Determinação e identificação de metabólitos e produtos de degradação em efluente hospitalar. 2013** (Tese de Doutorado, Tese de Doutorado (Doutorado em Química Analítica) -Universidade Federal de Santa Maria).

MIYAZAWA, M., & BARBOSA, G. D. C. (2015). **Dejeto líquido de suíno como fertilizante orgânico: método simplificado**. Boletim Técnico, (84).

MOREIRA, F.M.S e SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2ª edição. Lavras: Editora UFLA, 2006.

MORES, N., MORES, M., de OLIVEIRA FILHO, J. X., REBELATTO, R., KLEIN, C., COLDEBELLA, A., & de BARCELLOS, D. E. S. N. (2015). **Complexo das doenças respiratórias dos suínos (CDRS) em cinco estados brasileiros**. *Embrapa Suínos e Aves- Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*.

NEGREANU, Y; PASTERNAK, Z; JURKEVITCH, E; CYTRYN, E. **Impact of treated Wastewater Irrigation on Antibiotic Resistance in Agricultural Soils**. *Environ. Sci. Technol.* 2012, 46, 4800–4808

NETO, A. J. A., DO CARMO LANA, M., SECCO, D., MARTINS, M. F. L., TOKURA, L. K., & RAMPIM, L. **Atributos físicos de um Latossolo Argiloso sob sistema plantio direto após aplicação de água residuária de suinocultura (2016)**. *Acta Iguazu*, 5(1), 52-64.

O'NEILI, Jim. **Review on Antimicrobial Resistance. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations**. 2014. Disponível em: https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf. Acesso em 08 de jan de 2021.

OLIVEIRA, D. A.; PINHEIRO, A.; VEIGA, M. **Effects of pig slurry application on soil physical and chemical properties and glyphosate mobility**. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 38, n. 5, p. 1421-1431, 2014

OLIVEIRA, Paulo Armando V. **Produção e manejo de dejetos de suínos**. Disponível em: http://www.cnpsa.embrapa.br/pnma/pdf_doc/8-PauloArmando_Producao.pdf. Acesso em 07 de abr de 2021.

OSÍŃSKA, A., KORZENIEWSKA, E., HARNISZ, M., & NIESTĘPSKI, S. (2017). **Impact of type of wastewater treatment process on the antibiotic resistance of bacterial populations**. In *E3S Web of Conferences* (Vol. 17, p. 00070). EDP Sciences.

PARTRIDGE, S. R., TSAFNAT, G., COIERA, E., & IREDELL, J. R. (2009). **Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons**. *FEMS microbiology reviews*, 33(4), 757-784.

PENÊDA, Paula Adriana Barbosa Ferreira. **Ocorrência e Persistência dos Antibióticos nos solos.** 2016. Dissertação de Mestrado. Porto, Portugal.

PENG, S., WANG, Y., ZHOU, B., & LIN, X. (2015). **Long-term application of fresh and composted manure increase tetracycline resistance in the arable soil of eastern China.** *Science of the Total Environment*, 506, 279-286.

PEREIRA, A. R., OLIVEIRA PARANHOS, A. G., AQUINO, S. F., & QUEIROZ SILVA, S. (2021). **Distribution of genetic elements associated with antibiotic resistance in treated and untreated animal husbandry waste and wastewater.** *Environmental Science and Pollution Research*, 1-24.

PERUCHI, L. M., FOSTIER, A. H., & RATH, S. (2015). **Sorption of norfloxacin in soils: analytical method, kinetics and Freundlich isotherms.** *Chemosphere*, 119, 310-317.

PONTES, V.V.M; CARNEIRO, Manuel. C; VAITSMAN, D.S; MONTEIRO, M.I.C; SILVA, L.I.D; SOUZA, E.M.F; NETO, A.A. **Fast and simultaneous ultrasound-assisted extraction of exchangeable-NH₄⁺, NO₃⁻ and NO₂⁻ species from soils followed by ion chromatography. Chemical Speciation and Bioavailability** (2012). Rio de Janeiro, v.24, p. 227-233.

PREZOTTI, L.C.; GUARÇONI, A.M. **Guia de interpretação de análise de solo e foliar.** Disponível em: <https://biblioteca.incaper.es.gov.br/digital/bitstream/item/40/1/Guia-interpretacao-analise-solo.pdf>. Vitória, ES: Incaper, 2013. Acesso em 01 de set de 2021.

RAUBER, L. P., PICCOLLA, C., MAFRA, A., ANDRADE, A., & CORREA, J. (2010). **Carbono orgânico e agregação do solo sob aplicação de dejetos de suínos.** *Teresina. Novos caminhos para a agricultura conservacionista no Brasil.* Teresina: Embrapa Meio-Norte: Universidade Federal do Piauí, 2010.

REIS, Felipe Costa Claro. **Investigação química de complexos de coordenação dos antibióticos enrofloxacina e norfloxacina combinados ao íon Ru (III) e suas interações com biomolécula alvo** “. Ribeirão Preto, 2014. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP.

REZENDE, V. O. **Efeito da fertirrigação com água residuária de suinocultura nos atributos químicos do solo e na produção dos capins tifton 85 e xaraés.** 2013. 60 f. 2013. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Área de Concentração em Produção Vegetal)– Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. Martinez, 2008 J.L. Martinez. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments *Science*, 321 (2008), pp. 365-367

ROSSI, José Rafael. **Tratamento eletroquímico do antibiótico cloridrato de tetraciclina em efluente sintético.** 2017. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

SALAZAR, F., CHARLON, V., & PALHARES, J. (2019). **Glosario de terminos en manejo de estiercol y produccion animal.**

SAMPAIO, J. A., FRANÇA, S. C. A., & BRAGA, P. F. A. (2007). **Tratamento de minérios: práticas laboratoriais**. CETEM/MCT.

SANTOS, C.D.S.M. **Visão de futuro para a produção de antibióticos: tendências de pesquisa, desenvolvimento e inovação**. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2014. Tese de Doutorado. <http://186.202.79.107/download/visao-de-futuro-na-producao-de-antibioticos.pdf>.

SAPKOTA, Amy R. "Water reuse, food production and public health: Adopting transdisciplinary, systems-based approaches to achieve water and food security in a changing climate." (2019): 576-580.

SARIBAS, Z. E. Y. N. E. P., TUNCKANAT, F. A. T. M. A., & PINAR, A. (2006). **Prevalence of erm genes encoding macrolide-lincosamide-streptogramin (MLS) resistance among clinical isolates of Staphylococcus aureus in a Turkish university hospital**. Clinical microbiology and infection, 12(8), 797-799.

SCAVUZZI, Aleksandra Maria Lima. **Investigação de genes de resistência a quinolonas e avaliação de alterações estruturais com o uso de antimicrobianos em isolados de *Klebsiella pneumoniae* portadores do gene bla_{KPC}**. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2015.

SCHWARZ, S.; ROBERTS, M. C.; WERCKENTHINA, C.; PANG, Y.; LANGE, C. **Tetracycline resistance in Staphylococcus spp. from domestic animals**. Veterinary Microbiology. v. 63, p. 217-227, 1998.

SCOLARI, Tânia Maria Giacomelli. **Dejetos de suínos como adubo do solo: quanto deve ser aplicado?** Disponível em: <https://www.suinoindustrial.com.br/imprensa/dejetos-de-suinos-como-adubo-do-solo-quanto-deve-ser-aplicado/20010605-114001-0721>. Acesso em 02 de setembro de 2021.

SECRETARIA ESTADUAL DO DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL E DO TURISMO - SEDEST. Resolução Sedest Nº 15 DE 05/03/2020. **Estabelece condições e critérios e adota outras providências, para o licenciamento ambiental de Empreendimentos de Suinocultura no Estado do Paraná**. Disponível em: <https://www.legislacao.pr.gov.br/legislacao/listarAtosAno.do?action=exibir&codAto=232861&indice=2&totalRegistros=75&anoSpan=2021&anoSelecionado=2020&mesSelecionado=0&isPaginado=true>. Acesso em 14 de jun de 2021.

SENAR- Serviço Nacional de Aprendizagem Rural. **Irrigação: fertirrigação e reuso**. / Serviço Nacional de Aprendizagem Rural. – Brasília: Senar, 2019

SILVA, Cássia Cristiani Pinheiro. **Alterações físicas em um solo fertirrigado com água residual de suinocultura**. 2016.36 f. Tese (Mestrado) - Curso de Ciências Ambientais, Universidade Federal de Mato Grosso, Sinop, 2016

SILVA, K. C. D. (2021). **O uso intensivo de antibióticos na agropecuária e seu impacto na saúde pública: uma revisão narrativa.** Repositório Universitário da Ânima (RUNA)

SONI B , BARTELT-HUNT SL, SNOW DDET AL. . **Narrow grass hedges reduce tylosin and associated antimicrobial resistance genes in agricultural runoff.** *J Environ Qual*2015;44:895

SPADOTTO, C,A; RIBEIRO, WC. **Gestão de Resíduos na Agricultura e na Agroindústria.** Bocatú: FEPAF:2006. EMBRAPA.

SUI, Q., ZHANG, J., CHEN, M., TONG, J., WANG, R., & WEI, Y. (2016). **Distribution of antibiotic resistance genes (ARGs) in anaerobic digestion and land application of swine wastewater.** *Environmental Pollution*, 213, 751-759.

TAO, C.; HSU, B.; JI, W.; HSU, T.; KAO, P.; HSU, C.; SHEN, S.; SHEN, T.; WAN, T.; HUANG, Y. **Evaluation of five antibiotic resistance genes in wastewater treatment systems of swine farms by real-time PCR.** *Science of the Total Environment*, v. 496, p. 116-121, 2014.

TAVARES, Noemia UL; BERTOLDI, Andréa D .; MUCCILLO-BAISCH, Ana Luiza. **Prescrição de antimicrobianos em unidades de saúde da família no Sul do Brasil.** *Cafajeste. Saúde Pública* , Rio de Janeiro, v. 24, n. 8, p. 1791-1800, agosto de 2008. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2008000800008&lng=en&nrm=iso>. acesso em 11 de março de 2020.

TAVARES, Walter . **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico/Walter Tavares.** 3. ed. rev. e atual. -- São Paulo: Editora Atheneu, 2014.

TER LAAK, Thomas L.; GEBBINK, Wouter A.; TOLLS, Johannes. **The effect of pH and ionic strength on the sorption of sulfachloropyridazine, tylosin, and oxytetracycline to soil.** *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, v. 25, n. 4, p. 904-911, 2006.

UDIKOVIC-KOLIC, N., WICHMANN, F., BRODERICK, N.A., HANDELSMAN, J., 2014. **Bloom of resident antibiotic-resistant bacteria in soil following manure fertilization.** *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 111 (42), 15202–15207.

UNIÃO EUROPEIA -UE. **Regulamento (UE) 2020/741 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de maio de 2020. relativo aos requisitos mínimos para a reutilização da água.** *Jornal Oficial da União Europeia.* Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX:32020R0741>. Acesso em: 19 de jul de 2021.

VAN GOETHEM, M. W., PIERNEEF, R., BEZUIDT, O. K., VAN DE PEER, Y., COWAN, D. A., & MAKHALANYANE, T. P. (2018). **A reservoir of ‘historical’ antibiotic resistance genes in remote pristine Antarctic soils.** *Microbiome*, 6(1), 1-12.

VRIES, L. E.; CHRISTENSEN, H.; SKOV, R. L.; AARESTRUP, F. M; AGERSØ, Y. **Diversity of the tetracycline resistance gene tet(M) and identification of Tn916- and Tn5801-like**

(Tn6014) transposons in Staphylococcus aureus from humans and animals. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v.64, n.3, p.490-500, 2009.

WANG, F. H., QIAO, M., LV, Z. E., GUO, G. X., JIA, Y., SU, Y. H., & ZHU, Y. G. (2014). **Impact of reclaimed water irrigation on antibiotic resistance in public parks, Beijing, China.** Environmental Pollution, 184, 247-253.

WANG, J., LIN, H., SUN, W., XIA, Y., MA, J., FU, J., ... & QIAN, M. (2016). **Variations in the fate and biological effects of sulfamethoxazole, norfloxacin and doxycycline in different vegetable–soil systems following manure application.** *Journal of hazardous materials*, 304, 49-57.

WEN, X., MI, J., WANG, Y., MA, B., ZOU, Y., LIAO, X., WU, Y., 2019. **Occurrence and contamination profiles of antibiotic resistance genes from swine manure to receiving environments in Guangdong Province southern China.** Ecotoxicol. Environ. Saf. 173,96–102.

WERTH, Brian J. **Fluoronoquinolonas** (2020) . Manual MSD para profissionais de Saúde. Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt-br/profissional/doen%C3%A7as-infecciosas/bact%C3%A9rias-e-f%C3%A1rmacos-antibacterianos/fluoroquinolonas>. Acesso em: 24 de ago de 2021.

WERTH, Brian J **Sulfonamidas.** Manual MSD para profissionais de Saúde Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt-br/profissional/doen%C3%A7as-infecciosas/bact%C3%A9rias-e-f%C3%A1rmacos-antibacterianos/sulfonamidas>. Acesso em: 24 de ago de 2021.

WHO - World Health Organization **.Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater** / World Health Organization(2006). Disponível em: <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/110845/retrieve>. Acesso em 04 de jul de 2021.

__**Antimicrobial resistance: global report on surveillance**”(2014). Disponível em : https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748_eng.pdf;jsessionid=5196F9ABD7400873C4889BBE74D71A59?sequence=1. Acesso em 04 de jul de 2021.

__**WHO - World Health Organization. Antimicrobial resistance** (2018). Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>. Acesso em 26 de mar de 2020.

WORLD BANK GROUP, 2016. **Annual freshwater withdrawals, agriculture (% of total freshwater withdrawal).** The World Bank Group, Washington, D.C. Disponível em: <https://data.worldbank.org/indicator/er.h2o.fwag.zs>). Acesso em : 15 de out de 2021.

YANG, J. F., YING, G. G., LIU, S., ZHOU, L. J., ZHAO, J. L., TAO, R., & PENG, P. A. (2012). **Biological degradation and microbial function effect of norfloxacin in a soil under different conditions.** *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 47(4), 288-295.

YONEYAMA, H.; KATSUMATA, R. **Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development.** Bioscience Biotechnology and Biochemistry, v. 70, n. 5, p. 1060-1075 2006

ZEINELDIN, M., ALDRIDGE, B., & LOWE, J. (2019). **Antimicrobial effects on swine gastrointestinal microbiota and their accompanying antibiotic resistome.** Frontiers in microbiology, 10, 1035.

ZHANG, Y., SHEN, G., HU, S., HE, Y., LI, P., & ZHANG, B. (2021). **Deciphering of antibiotic resistance genes (ARGs) and potential abiotic indicators for the emergence of ARGs in an interconnected lake-river-reservoir system.** Journal of Hazardous Materials, 410, 124552.

APÊNDICE

A- QUANTIFICAÇÃO DE ELEMENTOS DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS NAS AMOSTRAS DO EFLUENTE TRATADO

Abundância absoluta	Amostras	<i>ermB</i>	<i>sulI</i>	<i>blaTEM</i>	<i>tetA</i>	<i>qnrB</i>	<i>Int1</i>	<i>RNAr16S</i>
	E1	4.69E+05	6.08E+05	5.21E+04	1.07E+05	1.73E+03	2.26E+05	6.75E+05
E2	6.70E+05	1.39E+04	7.40E+04	5.14E+03	1.65E+02	1.25E+03	9.05E+05	
E3	8.38E+05	1.62E+07	1.22E+05	2.96E+04	1.12E+05	2.70E+03	1.41E+06	
E4	7.30E+05	1.02E+08	1.29E+05	4.91E+04	3.98E+05	6.96E+04	1.53E+05	
DP	1.34E+05	4.22E+07	3.23E+04	3.76E+04	1.62E+05	9.15E+04	4.52E+05	
Média	6.77E+05	2.97E+07	9.43E+04	4.77E+04	1.28E+05	7.49E+04	7.86E+05	
Abundância absoluta		<i>ermB</i>	<i>sulI</i>	<i>blaTEM</i>	<i>tetA</i>	<i>qnrB</i>	<i>Int1</i>	<i>RNAr16S</i>
	E1	5.67	5.78	4.72	5.03	3.24	5.35	5.83
E2	5.83	4.14	4.87	3.71	2.22	3.10	5.96	
E3	5.92	7.21	5.09	4.47	5.05	3.43	6.15	
E4	5.86	8.01	5.11	4.69	5.60	4.84	5.18	
Média	5.83	7.47	4.97	4.68	5.11	4.87	5.90	
Abundância relativa		<i>ermB</i>	<i>sulI</i>	<i>blaTEM</i>	<i>tetA</i>	<i>qnrB</i>	<i>Int1</i>	
	E1	6.95E-01	9.01E-01	7.72E-02	1.59E-01	2.56E-03	3.35E-01	
E2	7.40E-01	1.54E-02	8.18E-02	5.68E-03	1.82E-04	1.38E-03		
E3	5.94E-01	1.15E+01	8.65E-02	2.10E-02	7.94E-02	1.91E-03		
E4	4.77E+00	6.67E+02	8.43E-01	3.21E-01	2.60E+00	4.55E-01		
Média	1.70E+00	1.70E+02	2.72E-01	1.27E-01	6.71E-01	1.98E-01		
Abundância relativa	Amostras	<i>ermB</i>	<i>sulI</i>	<i>blaTEM</i>	<i>tetA</i>	<i>qnrB</i>	<i>Int1</i>	
	E1	-0.16	-0.05	-1.11	-0.80	-2.59	-0.48	
E2	-0.13	-1.81	-1.09	-2.25	-3.74	-2.86		
E3	-0.23	1.06	-1.06	-1.68	-1.10	-2.72		
E4	0.68	2.82	-0.07	-0.49	0.42	-0.34		
Média	0.23	2.23	-0.57	-0.90	-0.17	-0.70		

E1: coleta 1 (jan/2020), E2, coleta 2(ago/2020), E3: coleta 3(mar/2021), E4: coleta (abr/2021) . DP: desvio padrão das amostras. Fonte: a autora,

B- QUANTIFICAÇÃO DE ELEMENTOS DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS NAS AMOSTRAS NO AÇUDE

Abundância absoluta	<i>Amostras</i>	<i>ermB</i>	<i>sulI</i>	<i>blaTEM</i>	<i>tetA</i>	<i>qnrB</i>	<i>Int1</i>	<i>RNAr16S</i>
	A2	3.32E+01	3.01E+02	2.83E+03	1.96E+02	1.50E+00	5.91E+01	1.24E+03
A3	1.15E+00	1.57E+02	5.77E+02	2.57E+01	0.00E+00	3.38E+02	7.69E+01	
DP	1.60E+01	7.19E+01	1.13E+03	8.52E+01	7.52E-01	1.39E+02	5.83E+02	
Média	1.72E+01	2.29E+02	1.70E+03	1.11E+02	7.52E-01	1.98E+02	6.60E+02	
Abundância absoluta (log10)	<i>ermB</i>	<i>sulI</i>	<i>blaTEM</i>	<i>tetA</i>	<i>qnrB</i>	<i>Int1</i>	<i>RNAr16S</i>	
	A2	1.52	2.48	3.45	2.29	0.18	3.09	
A3	0.06	2.20	2.76	1.41		2.53	1.89	
Média	1.23	2.36	3.23	2.04	-0.12	2.30	2.82	
Abundância relativa	<i>ermB</i>	<i>sulI</i>	<i>blaTEM</i>	<i>tetA</i>	<i>qnrB</i>	<i>Int1</i>		
	A2	2.67E-02	2.42E-01	2.28E+00	1.58E-01	1.21E-03	4.75E-02	
A3	1.50E-02	2.04E+00	7.50E+00	3.34E-01	0.00E+00	4.39E+00		
Média	2.09E-02	1.14E+00	4.89E+00	2.46E-01	6.05E-04	2.22E+00		
Abundância relativa (log10)	<i>ermB</i>	<i>sulI</i>	<i>blaTEM</i>	<i>tetA</i>	<i>qnrB</i>	<i>Int1</i>		
	A2	-1.57	-0.62	0.36	-0.80	-2.92	-1.32	
A3	-1.82	0.31	0.88	-0.48		0.64		
Média	-1.68	0.06	0.69	-0.61	-3.22	0.35		

Fonte: a autora

C-QUANTIFICAÇÃO DE ELEMENTOS DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS NAS AMOSTRAS DO SOLO 1

	Amostras	<i>ermB</i>	<i>sulI</i>	<i>blaTEM</i>	<i>tetA</i>	<i>qnrB</i>	<i>Int1</i>	<i>RNAr16S</i>
	Abundância absoluta	S1A	2.63E+05	4.29E+06	2.62E+06	8.51E+05	2.09E+03	2.09E+06
S1B		6.98E+05	9.28E+06	7.27E+06	1.93E+06	3.38E+04	5.76E+06	3.28E+09
S1C		1.63E+06	1.76E+10	1.98E+06	8.29E+06	3.52E+06	2.01E+07	1.93E+09
S1D		1.16E+07	1.09E+10	7.98E+05	2.97E+06	1.01E+06	1.24E+07	1.25E+09
DP		4.66E+06	7.52E+09	2.46E+06	2.86E+06	1.43E+06	6.85E+06	8.47E+08
Média		3.54E+06	7.14E+09	3.17E+06	3.51E+06	1.14E+06	1.01E+07	2.40E+09
Abundância absoluta			<i>ermB</i>	<i>sulI</i>	<i>blaTEM</i>	<i>tetA</i>	<i>qnrB</i>	<i>Int1</i>
	S1A	5.42	6.63	6.42	5.93	3.32	6.32	9.50
	S1B	5.84	6.97	6.86	6.29	4.53	6.76	9.52
	S1C	6.21	10.25	6.30	6.92	6.55	7.30	9.29
	S1D	7.06	10.04	5.90	6.47	6.00	7.09	9.10
	Média	6.55	9.85	6.50	6.55	6.06	7.00	9.38
	Abundância relativa		<i>ermB</i>	<i>sulI</i>	<i>blaTEM</i>	<i>tetA</i>	<i>qnrB</i>	<i>Int1</i>
S1A		8.39E-05	1.37E-03	8.34E-04	2.71E-04	6.65E-07	6.65E-04	
S1B		2.12E-04	2.83E-03	2.21E-03	5.88E-04	1.03E-05	1.75E-03	
S1C		8.47E-04	9.15E+00	1.03E-03	4.30E-03	1.83E-03	1.04E-02	
S1D		9.26E-03	8.72E+00	6.38E-04	2.37E-03	8.06E-04	9.93E-03	
Média		1.48E-03	2.97E+00	1.32E-03	1.46E-03	4.75E-04	4.20E-03	
Abundância relativa	Amostras	<i>ermB</i>	<i>sulI</i>	<i>blaTEM</i>	<i>tetA</i>	<i>qnrB</i>	<i>Int1</i>	
	S1A	-4.08	-2.86	-3.08	-3.57	-6.18	-3.18	
	S1B	-3.67	-2.55	-2.65	-3.23	-4.99	-2.76	
	S1C	-3.07	0.96	-2.99	-2.37	-2.74	-1.98	
	S1D	-2.03	0.94	-3.19	-2.62	-3.09	-2.00	
	Média	-2.83	0.47	-2.88	-2.84	-3.32	-2.38	

Fonte: a autora .S1A: coleta 1 (jan/2020), S1B, coleta 2(ago/2020), S1C: coleta 3(mar/2021), S1D: coleta (abr/2021)
 . DP: desvio padrão das amostras.

D -QUANTIFICAÇÃO DE ELEMENTOS DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS NAS AMOSTRAS DO SOLO 2

	Amostras	<i>ermB</i>	<i>sulI</i>	<i>blaTEM</i>	<i>tetA</i>	<i>qnrB</i>	<i>Int1</i>	<i>RNAr16S</i>
Abundância absoluta	S2A	1.9E+04	6.3E+05	2.4E+06	8.0E+05	0.0E+00	4.8E+05	3.9E+09
	S2B	5.1E+04	3.1E+05	1.2E+07	1.1E+06	7.8E+04	2.1E+05	4.5E+09
	S2C	1.7E+05	1.7E+09	9.5E+06	2.6E+05	7.8E+06	7.2E+06	8.1E+08
	S2D	6.2E+05	1.9E+09	9.4E+05	1.9E+05	4.8E+06	4.3E+06	5.8E+08
	DP	2.4E+05	9.0E+08	4.6E+06	3.9E+05	3.3E+06	2.9E+06	1.8E+09
	Média	2.1E+05	9.0E+08	6.2E+06	6.0E+05	3.2E+06	3.1E+06	2.45E+09
	Abundância absoluta (log10)		<i>ermB</i>	<i>sulI</i>	<i>blaTEM</i>	<i>tetA</i>	<i>qnrB</i>	<i>Int1</i>
S2A		4.28	5.80	6.39	5.90	#NÚM!	5.68	9.59
S2B		4.71	5.49	7.08	6.06	4.89	5.33	9.65
S2C		5.22	9.23	6.98	5.42	6.89	6.86	8.91
S2D		5.79	9.28	5.97	5.28	6.68	6.64	8.76
Média		5.33	8.95	6.79	5.78	6.50	6.48	9.38
Abundância relativa		<i>ermB</i>	<i>sulI</i>	<i>blaTEM</i>	<i>tetA</i>	<i>qnrB</i>	<i>Int1</i>	
	S2A	5.0E-06	1.6E-04	6.3E-04	2.1E-04	0.0E+00	1.2E-04	
	S2B	1.1E-05	7.0E-05	2.7E-03	2.6E-04	1.8E-05	4.8E-05	
	S2C	2.1E-04	2.1E+00	1.2E-02	3.2E-04	9.7E-03	8.9E-03	
	S2D	1.1E-03	3.3E+00	1.6E-03	3.3E-04	8.3E-03	7.5E-03	
	Média	8.8E-05	3.7E-01	2.6E-03	2.5E-04	1.3E-03	1.3E-03	
Abundância relativa (log10)	Amostras	<i>ermB</i>	<i>sulI</i>	<i>blaTEM</i>	<i>tetA</i>	<i>qnrB</i>	<i>Int1</i>	
	S2A	-5.30	-3.78	-3.20	-3.68		-3.91	
	S2B	-4.94	-4.16	-2.57	-3.59	-4.76	-4.32	
	S2C	-3.69	0.32	-1.93	-3.49	-2.01	-2.05	
	S2D	-2.97	0.52	-2.79	-3.48	-2.08	-2.12	
	Média	-4.06	-0.43	-2.59	-3.61	-2.88	-2.90	

Fonte: a autora .S2A: coleta 1 (jan/2020), S2B, coleta 2(ago/2020), S2C: coleta 3(mar/2021), S2D: coleta (abr/2021) . DP: desvio padrão das amostras.

E- QUANTIFICAÇÃO DE PH, COT E NT NAS AMOSTRAS DE S1 E S2

Amostra	pH				COT				NT			
	1 ^a coleta	2 ^a coleta	3 ^a coleta	4 ^a coleta	1 ^a coleta	2 ^a coleta	3 ^a coleta	4 ^a coleta	1 ^a coleta	2 ^a coleta	3 ^a coleta	4 ^a coleta
-	(H2O)				(mg de C/g da amostra)				(mg/L)			
S2A	7.48	7.63	8.89	8.46	13.53	8.12	27.44	15.74	0.304	0.076	0	0.1
S2B	7.47	7.32	7.89	8.55	23.29	14.56	27.5	16.99	0.29	0.054	0.05	0.07
S2C	7.71	7.55	8.39	8.73	25.51	11.72	7.84	12.49	0.296	0.042	0.02	0.04
S2D	7.81	7.57	8.47	8.71	30.67	13.8	29.03	7.61	0.277	0.22	0.01	0.05
S2E	7.68	7.51	8.59	7.96	28.94	16.25	13.32	13.32	0.297	0.058	0.01	0.13
Média	7.63	7.516	8.45	8.482	24.388	12.89	21.03	13.23	0.29	0.09	0.02	0.08
DP	0.13	0.10	0.32	0.28	6.00	2.79	8.72	3.24	0.01	0.06	0.02	0.03
S1A	6.77	5.38	6.31	6.3	26.68	22.1	26.47	24.52	0.348	0.794	0.16	0.29
S1B	6.85	6.2	6.24	6.29	27.66	32.9	40.4	29.17	0.302	0.318	0.09	0.25
S1C	6.49	6.44	6.43	6.03	31.86	24.2	26.79	27.29	0.369	0.199	0.07	0.51
S1D	6.46	6.22	6.37	6.06	25.08	27.73	31.42	31	0.369	0.409	0.07	0.71
S1E	5.9	6.34	6.36	6.18	24.83	33.85	30.58	28.41	0.278	0.125	0.13	0.45
Média	6.494	6.116	6.342	6.172	27.222	28.156	31.132	28.078	0.3332	0.369	0.104	0.442
DP	0.33	0.38	0.06	0.11	2.54	4.63	5.04	2.15	0.037	0.23	0.03	0.16

Fonte: a autora. Legenda: S1A a S1E referem-se às quintuplicatas do solo 1, já as amostras S2A a S2E às quintuplicatas do solo 2