



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
Instituto de Ciências do Mar
Curso de Ciências Ambientais

Raul Vitor Ferreira de Oliveira

**RESISTÊNCIA CRUZADA GLIFOSATO-ANTIBIÓTICO EM BACTÉRIAS GRAM
NEGATIVAS DE AMOSTRAS DE SOLO DE DIFERENTES SISTEMAS DE MANEJO
AGRÍCOLA EM EUSÉBIO-CE**

Fortaleza

2018

Raul Vitor Ferreira de Oliveira

RESISTÊNCIA CRUZADA GLIFOSATO-ANTIBIÓTICO EM BACTÉRIAS GRAM
NEGATIVAS DE AMOSTRAS DE SOLO DE DIFERENTES SISTEMAS DE MANEJO
AGRÍCOLA EM EUSÉBIO-CE

Monografia apresentada ao Curso de graduação em Ciências Ambientais do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Ambientais.

Orientadora: Dra. Margareth Borges Coutinho Gallo.

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Carneiro

Fortaleza

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F443r Ferreira de Oliveira, Raul Vitor.
RESISTÊNCIA CRUZADA GLIFOSATO-ANTIBIÓTICO EM BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS DE
AMOSTRAS DE SOLO DE DIFERENTES SISTEMAS DE MANEJO AGRÍCOLA EM EUSEBIO-CE /
Raul Vitor Ferreira de Oliveira. – 2018.
71 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do
Mar, Curso de Oceanografia, Fortaleza, 2018.

Orientação: Profa. Dra. Margareth Borges Coutinho Gallo.

Coorientação: Prof. Dr. Fernando Ferreira Carneiro.

1. Resistência a antibióticos. 2. Glifosato. 3. Impactos ambientais. I. Título.

CDD 551.46

RESISTÊNCIA CRUZADA GLIFOSATO-ANTIBIÓTICO EM BACTÉRIAS GRAM
NEGATIVAS DE AMOSTRAS DE SOLO DE DIFERENTES SISTEMAS DE MANEJO
AGRÍCOLA EM EUSÉBIO-CE

Raul Vitor Ferreira de Oliveira

Monografia apresentada ao Curso de
graduação em Ciências Ambientais do Instituto
de Ciências do Mar (LABOMAR) da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial à obtenção do título de Bacharel em
Ciências Ambientais.

Aprovada em: 12/12/2018.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Margareth Borges Coutinho Gallo (Orientadora)
Fundação Oswaldo Cruz - Ceará (FIOCRUZ-CE)

Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ms. Naila Saskia Melo Andrade
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A minha mãe, Rejane Maria
Ferreira de Oliveira.

AGRADECIMENTOS

A ciência é uma das mais belas construções humanas. Os sonhos e o conhecimento são dois motores que nos movem a conquistar maravilhas e, apesar de tudo nem sempre ser perfeito, seguimos em frente tentando melhorar.

Assim como a ciência, a formação de um jovem estudante de graduação não é fruto puro do esforço individual, mas uma construção coletiva onde milhares de pessoas trabalharam duro para garantir um bom resultado final.

Em minha jornada pela Universidade Federal do Ceará sou grato primeiramente a minha família, por todo apoio, paciência e, principalmente, por garantir-me o conforto e o carinho de um lar.

Agradeço aos meus amigos, em especial ao senhor Álef Vasconcelos que, com suas mãos cuidadosas e precisas, me ajudou diretamente no presente trabalho e me salvando de algumas enrascadas.

Agradeço à senhorita Mariana Melo minha maior companheira de “lanchos” no McDonald’s pela amizade e pelas conversas onde pudemos falar da mais alta filosofia a mais nova fofoca do dia.

Agradeço aos meus amigos TOPZEIRAS Lucas Peixoto e Luiz Rons por todo companheirismo e pelos rolês onde sobrevivemos à morte e a graduação (o que muitas vezes é quase a mesma coisa).

Agradeço com muito carinho ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP) e a todos os seus membros pelos momentos de aprendizagem, trabalho e também pelos momentos de festas, risadas e amizade.

Agradeço à Rosa Rebouças pelos cascudos e a Cristiane Teles, que sempre puxa minhas orelhas quando faço besteira, ajudando a me tornar uma pessoa e um profissional melhor com seus conselhos e seu conhecimento na bancada e na vida.

Agradeço à professora Oscarina Sousa pela inestimável oportunidade de trabalhar no LAMAP por todos esses anos, cedendo a estrutura e materiais do seu laboratório para este trabalho, por sua orientação durante os dois anos de monitoria e por despertar nesse estudante o interesse pela microbiologia.

Agradeço aos meus colegas e amigos da turma de 2015, com quem sempre posso contar para reclamar da vida e rir das nossas desventuras.

Agradeço ao professor Marcus Vinícius pelas melhores aulas de campo de todas.

Agradeço à Margareth Gallo e ao Fernando Carneiro pela orientação nesse trabalho e por terem investido nesse jovem de idéias ambiciosas e excêntricas.

Agradeço ao grupo de Saúde e Ambiente da Fiocruz-CE por despertar em mim um olhar mais social para os problemas ambientais, me fazendo sair da rotina do laboratório e conhecer outra realidade, muitas vezes invisível aos nossos olhos.

Um agradecimento especial ao Laboratório de Oceanografia Geológica (LOG) e especialmente à técnica Cida, que me ajudou nas análises granulométricas e me ensinou um pouco sobre o assunto.

Agradeço à Universidade Federal do Ceará, por me oferecer um mundo de oportunidades e conhecimento, bem como um ambiente repleto de diversidade que foi fundamental para minha formação.

Agradeço aos milhares de brasileiros que financiaram minha estada na universidade e o presente trabalho e aos vários cientistas do passado e do presente que abriram caminho para essa minha contribuição ao conhecimento.

E finalmente uma menção honrosa ao Periódicos Capes, Sci-Hub e ao Library Genesis por me darem acesso a vários livros e artigos que eu não conseguiria acessar pelas vias usuais.

“Em geral, chamamos de destino
as asneiras que cometemos...”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

O Brasil é campeão mundial no uso de agrotóxicos sendo o glifosato um dos mais comercializados no país. O uso indiscriminado dessa substância traz consequências, das quais muitas ainda são pouco conhecidas, para o meio ambiente e saúde humana. Estudos recentes indicam que o glifosato está relacionado ao surgimento de cepas bacterianas multirresistentes a antibióticos. O presente trabalho buscou avaliar a ocorrência de resistência cruzada glifosato/antibióticos em bactérias Gram negativas isoladas de solos submetidos a diferentes formas de manejo agrícola e em solo não manejado do município de Eusébio-CE. A resistência cruzada dos isolados foi verificada por meio de antibiograma. Os resultados mostraram que 86% dos isolados foram resistentes à Ampicilina, e que houve a ocorrência de cepas multirresistentes em todos os tipos de solos estudados. Os métodos utilizados neste trabalho foram capazes de demonstrar a cosseleção de cepas resistentes a diferentes antibióticos pelo glifosato em amostras ambientais.

Palavras-chave: Resistência a antibióticos. Glifosato. Impactos ambientais.

ABSTRACT

Brazil is a world champion in the use of agrochemicals, being glyphosate one of the most commercialized in the country. The indiscriminate use of this substance brings consequences, of which many are still little known, to the environment and human health. Recent studies indicate glyphosate is related to the emergence of multidrug-resistant antibiotic strains. The present work aimed to evaluate the occurrence of glyphosate/antibiotic cross resistance among Gram negative bacteria isolated from soils submitted to different forms of agricultural management and in unmanaged soil in the municipality of Eusébio-CE. The cross resistance of isolates was verified by means of antibiogram. The results revealed 86% of isolates as resistant to Ampicillin, and the occurrence of multiresistant strains in all studied soils. The methods used in this work were able to demonstrate the coselection of strains resistant to different antibiotics by glyphosate in environmental samples.

Keywords: Resistance to antibiotics. Glyphosate. Environmental impacts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural do glifosato e seus principais produtos de degradação.....	20
Figura 2. Principais mecanismos de resistência a antimicrobianos e modos de expressão.	24
Figura 3. Crescimento de bactérias em ágar MacConkey.....	30
Figura 4. Sítio de manejo agroflorestal.....	38
Figura 5. Sítio de manejo convencional.....	38
Figura 6. Amostras de solo agroflorestal (A1), não cultivado (A2) e de manejo convencional (A3).....	39
Figura 7. Contagem das colônias bacterianas crescidas em ágar MacConkey	40

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Os 10 agrotóxicos mais comercializados no Brasil em 2017	20
Gráfico 2. Perfil de resistência a antibióticos das cepas isoladas	47
Gráfico 3. Perfil de suscetibilidade a antibióticos das cepas isoladas	48
Gráfico 4. Perfil de resistência intermediária a antibióticos das cepas isoladas	48
Gráfico 5. Perfil de multirresistência a antibióticos das cepas isoladas	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação toxicológica dos agrotóxicos segundo a OMS.....	19
Tabela 2. Lista de reagentes e meios de cultura utilizados.....	28
Tabela 3. Lista de equipamentos utilizados.....	32
Tabela 4. Padrões interpretativos de diâmetros de halos de inibição para <i>Enterobacteriaceae</i>	34
Tabela 5. Lista de antibióticos testados.....	35
Tabela 6. Resultados da caracterização física dos solos estudados	39
Tabela 7. Contagem de bactérias resistentes ao glifosato crescidas em ágar MacConkey	40
Tabela 8. Caracterização morfotintorial dos isolados de bactérias provenientes do solo agroflorestal.....	42
Tabela 9. Caracterização morfotintorial dos isolados de bactérias provenientes do solo não cultivado	43
Tabela 10. Caracterização morfotintorial dos isolados de bactérias provenientes do solo de manejo convencional	43
Tabela 11. Resultados do antibiograma das cepas isoladas do solo de agrofloresta	44
Tabela 12. Resultado do antibiograma das cepas isoladas do solo não cultivado	45
Tabela 13. Resultado do antibiograma das cepas isoladas do solo de manejo convencional ..	46
Tabela 14. Índice de multirresistência a antibióticos (MAR) das cepas isoladas dos diferentes tipos de solos estudados	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A1	Amostra de solo da agrofloresta
A2	Amostra de solo não manejado
A3	Amostra de solo com manejo convencional
Amp	Ampicilina
CN°	Código para as cepas extraídas de A3
Cip	Ciprofloxacina
Clo	Cloranfenicol
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPSPS	5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase
Eri	Eritromicina
Ert	Ertapenem
Es	Estreptomicina
g	Gramas
Gen	Gentamicina
I	Resistência intermediária a antibiótico
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
MDR	Multidrug resistant
ml	Mililitros
OMS	Organização Mundial de Saúde
PN°	Código para as cepas extraídas de A1
PDR	Pandrug resistant
pH	Potencial hidrogeniônico
R	Resistência a antibiótico
S	Sucetibilidade a antibiótico
SN°	Código para as cepas extraídas de A2
Tet	Tetraciclina
TSA	Trypticase soy agar
UFC	Unidade formadora de colônias

SUMÁRIO

1	Introdução.....	14
2	Referencial teórico.....	16
2.1	O solo, sua microbiota e a família Enterobacteriaceae	16
2.2	Agrotóxicos e seus impactos.....	17
2.2.1	Glifosato.....	19
2.3	Resistência bacteriana a antibióticos.....	22
2.3.1	A Resistência cruzada pesticida-antibiótico.....	25
2.4	Sistemas de manejo agrícola convencional e alternativo.....	26
3	Objetivos	27
3.1	Objetivos específicos	27
4	Materiais e métodos	28
4.1	Reagentes e meios de cultura.....	28
4.2	Preparo de soluções e meios de cultura.....	29
4.2.1	Solução de desagregação enriquecida com glifosato.....	29
4.2.2	Solução salina 0,85%.....	29
4.2.3	Solução padrão de McFarland 0,5	29
4.2.4	Ágar McConkey	30
4.2.5	Ágar TSA enriquecido com glifosato.....	31
4.2.6	Meios de cultura usados no antibiograma	31
4.3	Caracterização morfotintorial dos isolados	31
4.4	Equipamentos utilizados.....	32
4.5	Procedimento de coleta.....	32
4.6	Extração, contagem e isolamento das bactérias Gram negativas resistentes ao glifosato.....	33
4.7	Teste de suscetibilidade a antimicrobianos (antibiograma).....	34
4.8	Caracterização das amostras de solo.....	36

4.8.1	Granulometria.....	36
4.8.2	Teor de matéria orgânica.....	37
5	Resultados e discussão.....	37
5.1	Caracterização dos solos coletados.....	37
5.2	Contagem padrão em placas e caracterização morfológica dos isolados.....	40
5.3	Antibiograma.....	44
6	Conclusões e perspectivas.....	51
7	Considerações finais.....	52
8	Referências.....	53

1 INTRODUÇÃO

A agricultura é grande responsável pela pujança econômica de nosso país em um modelo pautado predominantemente na busca constante por alta produtividade que, a partir da “Revolução Verde” nos anos 60-70, não é mais obtida somente pela expansão das terras cultivadas, mas pela crescente mecanização no campo, avanços em genética capazes de adaptar culturas aos nossos climas e solos, bem como o uso de compostos químicos sintéticos como fertilizantes, para suprir as necessidades de nutrientes dos cultivos e biocidas para eliminar organismos considerados nocivos (BAUAINAIN *et. al.* 2014).

Como reflexo do crescimento do setor agrícola de nossa economia verifica-se um aumento considerável no consumo de agrotóxicos. O Brasil ocupa a primeira posição no consumo mundial de agrotóxicos e, em 2015, instituições como o Ministério da Saúde e o Instituto Nacional do Câncer divulgaram que, em média, cada cidadão consome cerca de 5 kg de agrotóxicos por ano (HUPFFER e POL. 2017). Dentre todos os princípios ativos comercializados, o glifosato predomina, correspondendo a 45% das vendas em território nacional no ano de 2017 (IBAMA, 2018).

A grande disseminação no uso dessas substâncias nas últimas décadas não veio livre de graves custos ambientais, destacando-se o impacto do crescente uso de agrotóxicos no país. O Dossiê da Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO, 2015 e 2018) faz extensa revisão sobre o tema, listando significativos impactos que esses compostos têm sobre a saúde humana, com especial destaque para a contaminação de corpos hídricos, a crescente presença de resíduos de pesticidas superiores aos limites estabelecidos pela legislação nos alimentos consumidos no país e os casos de intoxicação que afetam principalmente os trabalhadores do campo e populações economicamente vulneráveis. O documento destaca que boa parte dos danos causados por agrotóxicos à saúde humana e ao ambiente não são totalmente compreendidos, ainda existindo grandes lacunas no conhecimento científico.

Uma dessas lacunas é o impacto dos agrotóxicos sobre a microbiota do solo, que pode funcionar como um relevante indicador ambiental, pois os microrganismos são sensíveis a fatores naturais ou antrópicos que alterem a qualidade daquela matriz, estando intimamente correlacionados a sua produtividade e saúde do ecossistema. Entretanto, faz-se necessário o estabelecimento de parâmetros precisos para avaliar o estado do solo quanto a aspectos microbiológicos referentes à diversidade e outras características relevantes de modo a utilizá-los para classificar diferentes sistemas agrícolas (SILVEIRA e FREITAS 2007).

Estudos recentes indicam que microrganismos expostos aos agrotóxicos são submetidos à pressão seletiva desenvolvendo resistência a esses compostos e também a alguns antimicrobianos em um fenômeno denominado “resistência cruzada” que já foi observado em fungos das espécies *Cryptococcus gatti* e *C. neoformans* (BASTOS *et. al.* 2017), em bactérias do gênero *Bacillus* isoladas de amostras de solos agrícolas na Índia (RANGASAMY *et. al.* 2017) e em experimentos *in vitro* usando cepas de *E. coli* e *Salmonella enterica* submetidas a concentrações sub-letais de glifosato, dicamba e ácido diclorofenoxiacético (2,4 -D) (KURENBACH *et. al.* 2015).

A resistência cruzada bactéria-antibióticos representa um importante campo de estudos e pode implicar significativo risco à saúde humana. Em editorial publicado em 2017, a revista científica *Nature*, na sua publicação dedicada à microbiologia, destaca o esforço global pela busca por novos antibióticos e formas de tratamento alternativas no combate a infecções causadas por bactérias resistentes, que vêm causando cada vez mais vítimas em todo o mundo. Dentre as principais causas de óbitos em infecções relacionadas à assistência à saúde estão os microrganismos resistentes a fármacos (SOUZA *et. al.* 2015).

Frente a isso, surgem formas de produção agrícola que buscam no manejo das relações ecológicas livres do uso de pesticidas e outros insumos químicos uma maneira sustentável de fazer agricultura, eliminando ou diminuindo as externalidades negativas inerentes ao modelo convencional (MAZZOLENI e NOGUEIRA. 2006).

Em um cenário onde as políticas públicas favorecidas pelo forte “lobby” de setores de interesse ligados ao agronegócio tendem a ir contra o bem estar e a saúde da população e a preservação do ambiente, estudos que sirvam como subsídio à implantação de alternativas ao atual modelo produtivo agrícola e contribuam na geração de conhecimento básico para compreensão de fenômenos naturais ainda não bem compreendidos se fazem fundamentais para transformar a preocupante realidade na qual estamos inseridos.

Assim, o presente trabalho buscou verificar a ocorrência da resistência cruzada glifosato-antibiótico em bactérias da microbiota de solos submetidos a diferentes sistemas de manejo agrícola em Eusébio-CE almejando contribuir para uma melhor compreensão desse fenômeno.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O solo, sua microbiota e a família Enterobacteriaceae

De acordo com a EMBRAPA (2006), o solo é definido como uma coleção de corpos naturais constituída por partes sólidas, líquidas e gasosas formada por materiais minerais e orgânicos que apresentam uma dinâmica, constituindo a maior parte do manto superficial das extensões continentais. Contudo, deve-se levar em consideração que o solo possui componentes vivos, uma miríade de organismos cuja dinâmica biológica exerce função primordial na agregação do solo, tornando-o grumoso e permeável à água e ao ar, além de mobilizar e disponibilizar nutrientes fundamentais para o crescimento das plantas (PRIMAVESI, 2008).

O solo é elemento fundamental para a existência da civilização. A humanidade é tão dependente dele que diversos povos antigos prosperaram ou decaíram devido a sua capacidade de manejar essa matriz ambiental de modo eficiente para obtenção dos recursos que necessitavam (PÉREZ *et. al.* 2016).

A biota do solo inclui representantes de todos os grandes domínios da vida sendo as eubactérias os seres mais abundantes, que encontram nessa matriz ambiental condições ideais para se multiplicarem. No solo, esses organismos são responsáveis por uma série de processos fundamentais que contribuem para a qualidade e equilíbrio desse substrato, como, por exemplo, a biodisponibilização de fósforo e nitrogênio, nutrientes essenciais para as plantas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Suas funções ecológicas e sua sensibilidade às ações antrópicas fazem das bactérias possíveis indicadores da qualidade do solo, onde, em geral, se buscam avaliar grupos específicos dentro da enorme diversidade presente, como as fixadoras de fósforo, nitrogênio, produtoras de celulase, etc., bem como a biomassa microbiana e a respiração basal do solo (SILVEIRA e FREITAS. 2007, BARROS *et. al.* 2010, BUENO *et. al.* 2018).

O grupo dos coliformes é bem conhecido como indicador ambiental, englobando amplo número de bactérias que colonizam o trato intestinal de animais de sangue quente e que são capazes de fermentar lactose em 48 horas quando incubadas a 35° C. A presença de coliformes em amostras ambientais indica a condição sanitária do solo e da água, entretanto não é um parâmetro capaz de revelar a qualidade do solo em um sentido mais amplo (ZILLI *et. al.* 2003).

Os coliformes são bactérias Gram Negativas pertencentes à família Enterobacteriaceae, cujas espécies estão distribuídas por todo o mundo, sendo encontrados em solo, água, animais, vegetais e alimentos. Algumas espécies são patogênicas aos seres humanos, causando infecções oportunistas como septicemia, meningite, pneumonia e infecções no trato urinário enquanto outras têm significativa importância econômica quando usadas em processos biotecnológicos (NASCIMENTO e ARAÚJO, 2013). Além disso, a facilidade de cultivo em meios específicos e na sua manipulação genética fazem desse grupo bacteriano um dos mais estudados pelos pesquisadores em laboratório (GARRITY *et. al.*, 2002). Entre os gêneros mais importantes da família Enterobacteriaceae estão o *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Tatumella* e *Yersinia*.

No início de 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS), pela primeira vez na história, divulgou uma lista de bactérias resistentes e fez um apelo pelo desenvolvimento de novos antibióticos, já que a descoberta de novas opções de tratamento contra estes organismos vem diminuindo há anos. Além da *Pseudomonas aeruginosa*, estão citadas no documento diversas Enterobacteriaceae incluindo *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Serratia* spp. e *Proteus* spp.

Enterobacteriaceae é uma das famílias mais abundantes no solo, juntamente com *Bacillaceae*, *Cellulomonadaceae* e *Nocardiaceae* (SILVA e NAHAS, 2002).

2.2 Agrotóxicos e seus impactos

A legislação brasileira define “agrotóxicos” como:

Produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento. (BRASIL, 2002)

Podemos dizer que os agrotóxicos são xenobióticos, termo derivado das palavras gregas *xenos* (estranho) e *bios* (vida), compostos químicos complexos e estranhos à vida, cuja

descarga no ambiente poderá acarretar impactos à biota de acordo com uma série de processos físicos, químicos e biológicos (MELO e AZEVEDO. 2008).

O termo “Agrotóxico” engloba uma vasta gama de substâncias, sendo muitas de origem biológica e com grande diversidade de estruturas químicas, podendo ser classificadas quanto ao tipo de praga que combatem em inseticidas, herbicidas, fungicidas, desfolhantes e fumigantes (PERES *et. al.* 2003).

Os agrotóxicos foram um dos pilares da “Revolução Verde”, responsáveis por um aumento considerável da produtividade nas culturas agrícolas. Apesar de diversos compostos terem sido usados ao longo da história como praguicidas, podemos dizer que a era dos pesticidas sintéticos começa de fato na década de 40 do século XX, quando esses compostos obtiveram tanto sucesso em controlar pestes que sua adoção foi geral, contando com cada vez mais compostos descobertos a cada ano (EDWARDS, 1973).

Não tardou para se verificarem prejuízos decorrentes do uso disseminado dos agrotóxicos. Em 1962, Rachel Carson, em seu famoso livro “Primavera Silenciosa”, documenta os graves danos causados pelo uso do DDT (diclorodifeniltricloroetano) nos EUA, trazendo a público efeitos como alterações de processos celulares das plantas, redução de populações de animais e danos à saúde humana (BONZI, 2013).

De acordo com Edwards (1973), o solo é o principal impactado pelo uso de agrotóxicos, pois acaba por tornar-se seu reservatório natural, sendo atingido por aplicações diretas, pulverização aérea, chuva, poeira e restos de plantas e animais que acumulam os compostos em suas estruturas e os disponibilizam ao meio após morrerem. Do solo os agrotóxicos podem escoar ou serem ressuspensos contaminando corpos hídricos, atmosfera e organismos. Ainda segundo Edwards, o tempo de persistência dos pesticidas no ambiente será determinado por inúmeros fatores bióticos e abióticos relativos à natureza da molécula do agrotóxico, o tipo de solo, pH, temperatura, matéria orgânica, tipo de cultivo e os microrganismos presentes no solo responsáveis por sua biodegradação.

Quanto aos seus efeitos à saúde, a OMS classifica os agrotóxicos em quatro classes toxicológicas, como pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação toxicológica dos agrotóxicos segundo a OMS

Classe Toxicológica	Toxicidade	DL/50%	Tarja Colorida
I	Extremamente tóxico	≤ 5 mg/kg	Vermelha
II	Altamente tóxico	Entre 5 e 50 mg/kg	Amarela
III	Medianamente tóxico	Entre 50 e 500 mg/kg	Azul
IV	Pouco tóxico	Entre 500 e 5000 mg/kg	Verde
-	Muito pouco tóxico	Acima de 5000 mg/kg	-

Fonte: OMS, 2009

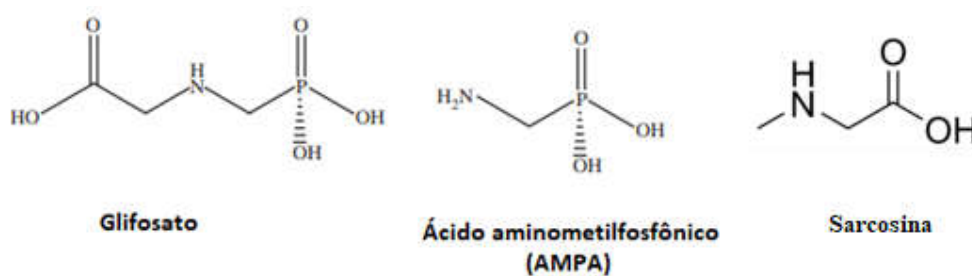
Zhang e colaboradores (2017) determinaram que a perda de diversidade microbiana no solo causada pelos agrotóxicos termina por aumentar a quantidade destes que é absorvida pelos vegetais cultivados que, posteriormente, serão usados na alimentação humana representando um risco ainda não mensurado à saúde.

2.2.1 Glifosato

N-(fosfometil)glicina (Figura 1), mais conhecido como glifosato, é o principal princípio ativo de diversos produtos usados como defensivos agrícolas. Foi introduzido em 1974, pela Monsanto, para ser aplicado em cultivos de soja geneticamente modificada para resistirem ao composto. A agência de proteção ambiental dos Estados Unidos considera o glifosato como sendo de toxicidade mais baixa quando comparado com seus análogos organoclorados e organofosforados (WEXLER, 2014).

O glifosato é um herbicida sistêmico, não seletivo, pertencente ao grupo químico das glicinas substituídas com amplo espectro de ação que atua inibindo a enzima EPSPS (5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase), catalizadora da síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, e inibidora da produção de clorofila, reduzindo a síntese proteica (GALLI e MONTEZUMA. 2005).

Figura 1. Fórmula estrutural do glifosato e seus principais produtos de degradação

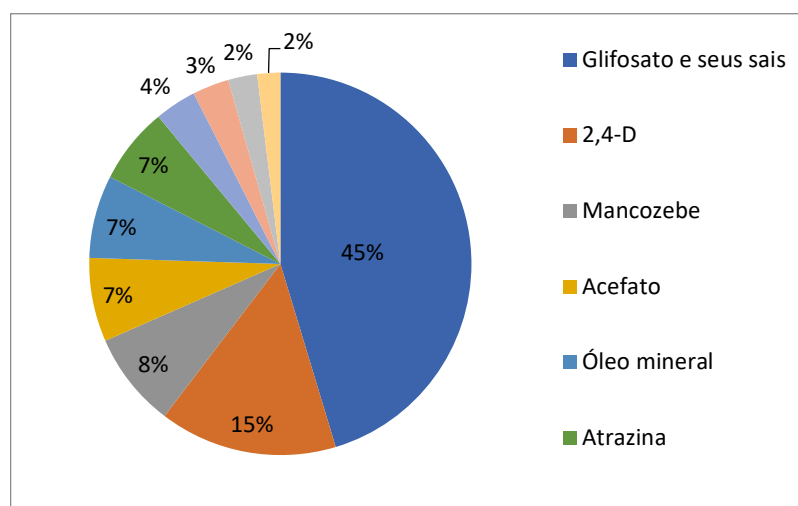


Fonte: elaborado pelo autor

Estudos epidemiológicos e experimentos *in vitro* apontam o glifosato como potencialmente cancerígeno (COSTA *et. al.* 2017; VAZQUEZ *et. al.* 2017; THONGPRAKAISANG *et. al.* 2013). Além disso, foi observada significativa contaminação do leite materno nas mulheres em áreas agrícolas onde há aplicação do agrotóxico (LIMA, 2017).

De acordo com o IBAMA, foram comercializadas cerca de 170 mil toneladas de glifosato no Brasil só em 2017, sendo o agrotóxico mais consumido no país (Gráfico 1). Apesar disso o glifosato não é coberto pelas análises de resíduos de agrotóxicos em alimentos realizadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2016).

Gráfico 1. Os 10 agrotóxicos mais comercializados no Brasil em 2017



Fonte: IBAMA, 2017

A taxa de degradação do glifosato depende do tipo de solo, pH e temperatura, entre outros fatores (SIMONSEN *et. al.* 2008;). Ele fica mais adsorvido em solos com maior teor de argila e óxidos de ferro, onde apresenta menor risco de lixiviação, porém degradação mais lenta, mas é rapidamente eliminado e degradado em solos mais arenosos. Um dos produtos de degradação do glifosato, o ácido aminometil fosfônico (AMPA; Figura 1), é mais persistente, com uma meia vida de 151 dias em contraste com 12 dias do glifosato, podendo ser reduzida pela presença de matéria orgânica e/ou pela grande quantidade de microrganismos presente nela (BERGSTROM *et. al.* 2011). A principal via de degradação do glifosato no solo é microbiana. No entanto, a diversidade da microbiota do solo pode ser reduzida pela aplicação de agrotóxicos e induzir o acúmulo destes compostos nos tecidos das plantas (ZHANG *et. al.* 2015). Na água, a mineralização do glifosato é mais rápida quando há presença de sedimentos. Inicialmente, o glifosato, que é usado pelos microrganismos como fonte de energia, é biodegradado através da via sarcosina, a qual está relacionada ao crescimento microbial. Posteriormente, a degradação via AMPA domina se ocorre escassez de alimento (WANG *et. al.* 2016).

Plantas e microrganismos apresentam diferentes níveis de sensibilidade ao glifosato e seus produtos de degradação. Assim, sua aplicação cada vez mais disseminada gera uma pressão seletiva capaz de alterar a composição de vários habitats, incluindo o solo, corpos hídricos, superfícies de plantas e até mesmo a microbiota de animais, e de causar sérios efeitos colaterais. Devido a isto, em 2015, a Organização Mundial de Saúde reclassificou o glifosato como provável carcinogênico aos seres humanos (VAN BRUGGEN *et. al.* 2018). Apesar disto, o glifosato é considerado de baixa toxicidade aos seres humanos e animais, precisando de doses muito altas para ser letal. No entanto, não são bem compreendidas as consequências da exposição por longo prazo ao herbicida (McCOMB *et. al.* 2008, OMS, 2005).

Nos organismos vivos essa alteração da comunidade bacteriana pelo glifosato tem efeitos negativos. Em aves, o glifosato parece selecionar bactérias prejudiciais no trato intestinal desses animais, favorecendo estirpes de *Salmonella* e *Clostridium* ao eliminar as bactérias responsáveis pelo bom equilíbrio da sua microbiota (SHEHATA *et. al.* 2012). Em ratos o glifosato alterou a razão entre bactérias Gram positivas e negativas no trato digestivo, favorecendo um isolado de *E. coli* resistente ao herbicida (LOZANO *et. al.* 2018).

2.3 Resistência bacteriana a antibióticos

Os antibióticos podem ser classificados de acordo com vários critérios como, por exemplo, origem, biossíntese, ação predominante, mecanismo de ação e estrutura química. Neste último critério, os antibióticos de origem natural e seus derivados semissintéticos podem ser classificados como: β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas, oxapeninas e monobactamas), tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, peptídeos cíclicos (glicopeptídeos, lipodepsipeptídeos), estreptograminas, entre outros (lincosamidas, anfenicóis, rifamicinas, etc). Os antibióticos de origem sintética são classificados em sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas (BAPTISTA, 2013).

A descoberta do antibiótico, a partir de um fungo do gênero *Penicillium* em 1929 por Alexander Fleming, revolucionou o tratamento de infecções bacterianas. Desde então os antibióticos se tornaram uma classe de fármacos fundamentais na medicina. Sem eles a maioria das cirurgias e transplantes seriam impossíveis e estaríamos sempre vulneráveis a infecções bacterianas. É certo que devemos a eles o grande aumento na expectativa de vida que obtivemos nas últimas décadas (BRITO e CORDEIRO, 2012).

No final da década de 1930, relatam-se os primeiros casos de resistência à sulfonamida. A enzima penicilinase, responsável por conferir às bactérias resistência à penicilina, foi identificada pelo mesmo grupo que descobriu o antibiótico apenas 12 anos após a sua introdução como terapêutico (DAVIES e DAVIES, 2010).

A resistência aos antibióticos dificilmente pode ser controlada, pois envolve uma gama variada de fatores e a ação humana criou um ambiente ideal para a disseminação desse fenômeno. Profissionais de saúde costumam prescrever antibióticos como uma estratégia de tratamento e esses medicamentos muitas vezes encontram-se disponíveis livremente para pessoas que se automedicam com essas drogas (ORZECH e NICTER, 2008). O uso cada vez mais disseminado e indiscriminado desses compostos proporcionou uma pressão seletiva que criou reservatórios de cepas resistentes em todos os ambientes. Além do uso em humanos, antimicrobianos são aplicados para profilaxia e tratamento de animais domésticos, na aquicultura, pecuária, avicultura, como biocidas em produtos alimentícios e de higiene pessoal e até mesmo no controle de pragas na agricultura (DAVIES e DAVIES, 2010).

De acordo com Kohanski e colaboradores (2010), o tratamento utilizando doses subletais de antimicrobianos pode conferir resistência a múltiplas drogas por estimular a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) capazes de induzir mutações nas bactérias.

Os mecanismos de resistência podem ser intrínsecos do microrganismo, conhecido como resistência natural, ou adquiridos por transmissão/aquisição de material genético presente em outro microrganismo, denominada de transferência horizontal de genes, ou por mutação (Figura 2). A transferência horizontal de genes se dá pelos seguintes mecanismos (BAPTISTA, 2013):

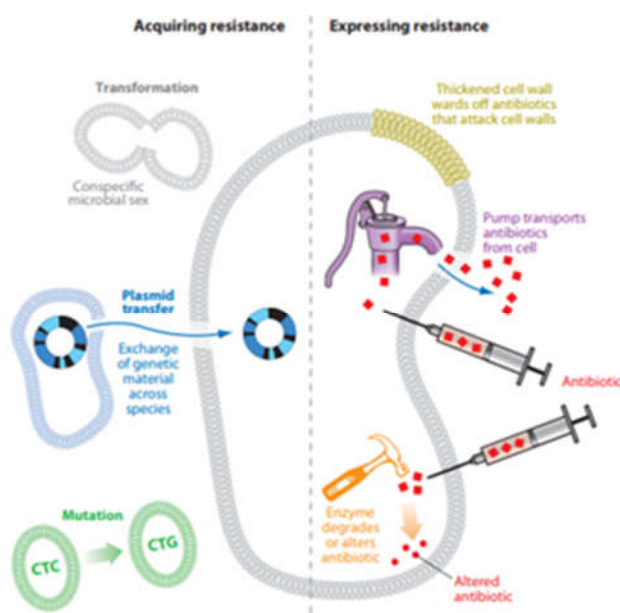
- Transformação: Ocorre transferência de partes de DNA de uma bactéria a outra. A capacidade de englobar material genético extracelular e sofrer transformação é designada de competência;
- Transdução: Bacteriófagos funcionam como vetores de DNA, transportando parcelas de DNA de um doador para um hospedeiro que pode incorporar essa nova parcela ao seu próprio DNA;
- Conjugação: Processo onde duas células bacterianas da mesma ou de diferentes espécies entram em contato e trocam porções de material genético entre si, como plasmídeos.
- Transposição: é um processo de transferência genética, resultante da interação entre duas bactérias diferentes, que na maioria das vezes utiliza a conjugação como via, porém os fragmentos de DNA transferidos são denominados transposões.

A resistência adquirida pode ser expressa das seguintes formas (BAPTISTA, 2013):

- Alterações na permeabilidade da membrana celular: Nas bactérias Gram negativas a penetração dos antibióticos na célula se dá pelas porinas, que formam canais hidrofílicos servindo para entrada dos fármacos através da membrana celular. Modificações na quantidade ou diâmetro das porinas impedem ou dificultam a entrada de antibióticos no interior da célula bacteriana. Atua como mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos, quinolonas, tetraciclina e à fosfomicina;
- Alteração do sítio de ligação: Caracteriza-se pela redução ou ausência de afinidade do antibiótico ao local de ação, como a estrutura da parede de peptidoglicano ou a síntese de proteínas e DNA. Atua como mecanismo de resistência aos beta-lactâmicos e glicopeptídeos, tetraciclina, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, oxazolinonas, lincosamida e estreptogramina B;

- Bombas de efluxo: São proteínas presentes na membrana celular que realizam o transporte de antibióticos do meio intracelular para o meio extracelular. Esse mecanismo atua sobre todas as classes de antibióticos, mas se mostra mais eficiente sobre tetraciclina e fluoroquinolonas;
- Produção de enzimas: Algumas bactérias são capazes de produzir enzimas capazes de inativar ou mesmo degradar o fármaco por meio de hidrólise, transferência de um grupo ou processo redox. Um grande exemplo é a β -lactamase que confere resistência aos β -lactâmicos.

Figura 2. Principais mecanismos de resistência a antimicrobianos e modos de expressão.



Fonte: ORZECH e NICTER, 2008.

A disseminação da resistência aos antimicrobianos torna-se ainda mais complexa, pois as bactérias passaram a apresentar resistência a mais de um agente antibiótico de diferentes classes e famílias. Apesar de ainda não haver um consenso acadêmico a respeito do tema, Magiorakos e colaboradores (2012) sugeriram algumas definições:

- MDR (*Multidrug-resistant*): Cepa bacteriana resistente a pelo menos um agente dentro de três ou mais categorias de antibióticos;

- XDR (*Extensively drug-resistant*): Cepa bacteriana que não apresenta suscetibilidade a pelo menos um agente antimicrobiano em todas as categorias com exceção de uma ou duas;
- PDR (*Pandrug-resistant*): Cepa bacteriana que não apresenta suscetibilidade a todos os agentes antimicrobianos em todas as categorias antimicrobianas.

Bactérias Gram negativas representam a maior parte das cepas emergentes multirresistentes a antimicrobianos especialmente devido ao seu potencial para sofrer mutações e sua ampla capacidade de compartilhar elementos móveis de DNA, transferindo a resistência para outras cepas (EXNER *et. al.* 2017).

2.3.1 A Resistência cruzada pesticida-antibiótico

Segundo Rangasamy e colaboradores (2018), quando uma bactéria desenvolve resistência a um pesticida por meio de mutações genéticas que permitem que ela também seja resistente a uma gama de antibióticos, esta nova resistência é chamada de resistência cruzada pesticida-antibiótico. Esta resistência é adquirida por meio de várias estratégias usadas pelas bactérias, comuns tanto contra pesticidas quanto antibióticos, para sobreviverem aos xenobióticos e se manifestam de formas variadas como, por exemplo:

- Formação de biofilmes;
- Criação de sítios ativos análogos a pesticidas e antibióticos;
- Expressão aumentada de genes relacionados à produção de enzimas estresse-tolerantes;
- Aumento no número de cópias dos genes essenciais para tolerância ao estresse;
- Aquisição de novos genes de resistência a antibióticos em grupos de genes para resistência a agrotóxicos transferidos de bactérias do solo;
- Obtenção de genes de resistência a antibióticos juntamente com genes de resistência a agrotóxicos por transferência horizontal por intermédio de transposões.

Algumas bactérias se tornam resistentes ao glifosato pela super expressão da enzima EPSPS, enzima chave envolvida na biossíntese de aminoácidos aromáticos na via chiquimato, ou pela alteração de seus aminoácidos, ou por resistência natural. Este último

mecanismo foi utilizado pela Monsanto no desenvolvimento de culturas transgênicas resistentes ao glifosato (SHEHATA *et. al.* 2013). Além de enzimas, algumas bactérias são capazes de produzir substâncias de baixo peso molecular que desempenham a função de proteger a célula contra o estresse oxidativo e de desintoxicação de agentes tóxicos exógenos, como é o caso do micotiol produzido por actinobactérias (LIU *et. al.* 2013). Kurenbach e colaboradores (2015) identificaram alterações no sistema de efluxo em cepas de *E. coli* e *Salmonella enterica* após sua exposição ao glifosato que lhes conferiu resistência ao aminoglicosídeo canamicina e à fluoroquinolona ciprofloxacina, os quais são usados para controlar patógenos insensíveis aos beta-lactâmicos e cefalosporinas, configurando um sério problema à saúde humana, visto reduzir o espectro de tratamentos clínicos.

Shin e colaboradores (2016) encontraram o expressivo valor de 95% de seus isolados apresentando resistência cruzada glifosato-penicilina em pomares de frutas cítricas tratadas com este antibiótico, indicando que a existência de resistência cruzada glifosato e β -lactâmicos.

A resistência cruzada pesticida-antibiótico representa um significativo problema para a saúde pública e a qualidade ambiental. Além da alteração na composição natural dos microbiomas, as cepas resistentes podem acabar transferindo seus genes de resistência a espécies patogênicas, ou elas mesmas virem a se tornar patogênicas oportunistas, terminando por infectar seres humanos em uma longa e complexa cadeia de causa e efeito (SMITH *et. al.* 2005, STINE *et. al.* 2007).

2.4 Sistemas de manejo agrícola convencional e alternativo

Considera-se como sistema de manejo agrícola convencional o cultivo caracterizado pela dependência de insumos como fertilizantes químicos e agrotóxicos para se manter a produtividade do solo bem como práticas que envolvam o revolvimento do solo com uma tendência a maior grau de mecanização (MARQUES, 2006. ROSSET *et. al.* 2014).

Segundo Marques (2006), o manejo convencional dos solos exige um baixo investimento inicial, porém aumenta ao longo do tempo, pois o esgotamento do solo demanda custos crescentes com fertilizantes químicos e medidas para conter processos erosivos. Com isso podemos dizer que não há sustentabilidade neste tipo de manejo.

Rosset e colaboradores (2014) citam os vários impactos associados ao manejo agrícola convencional, entre eles o excessivo uso de água para irrigação, contaminação e

salinização de corpos hídricos, erosão dos solos e desmatamento para expansão da fronteira agrícola. Deve-se destacar que apesar do sistema convencional ser predominante, ele, algumas vezes, pode acontecer associado a práticas alternativas como a adubação verde, rotação de culturas, plantio direto e sistemas de irrigação mais eficientes e econômicos.

Em contraposição ao modelo agrícola convencional, encontramos um conjunto de técnicas alternativas de manejo, buscando eliminar os impactos ambientais ou reduzi-los a um mínimo aceitável. Essas técnicas incluem cultivo de maior variedade de plantas que sejam bem adaptadas às condições locais, o uso de interações biológicas naturais para o combate a pragas, o manejo ecológico do solo e o uso de biofertilizantes, quando necessário (GONÇALVES e BOFF, 2002). Tais técnicas fazem parte daquilo que se conhece por agroecologia.

O uso de técnicas agroecológicas demonstra bom potencial para melhora da qualidade do solo. Na China, a conversão de trechos de floresta tropical e monocultura em agroflorestal aumentou o número de bactérias biodisponibilizadoras de fósforo na microbiota do solo local (WANG *et. al.* 2017). Além disto, pesquisadores demonstraram que a adoção do sistema agroflorestal no cultivo da *Hevea brasiliensis* aumentou a quantidade de carbono disponível nos agregados de solo (CHEN *et. al.* 2017).

Há um significativo impacto positivo da agricultura orgânica ou agroecológica na preservação da biodiversidade bem como na mitigação das mudanças climáticas devido à menor liberação de carbono na atmosfera (MORGERA *et. al.* 2012). Podemos somar a isso os benefícios sociais que a agricultura alternativa traz como segurança alimentar, maior proteção ao consumidor e melhores condições de trabalho aos agricultores.

3 OBJETIVOS

Isolamento seletivo de bactérias Gram negativas de amostras de solo em diferentes sistemas de manejo agrícola e verificação da resistência cruzada glifosato-antibióticos por meio de antibiograma.

3.1 Objetivos específicos

- Determinar alguns antibióticos que apresentam a resistência cruzada com o glifosato;

- Identificar a presença de cepas multirresistentes nos solos coletados;
- Realizar a caracterização parcial dos solos, identificando fatores capazes de contribuir nos resultados de resistência observados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes e meios de cultura

No presente trabalho foram utilizados reagentes e meios de cultura conforme especificados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Lista de reagentes e meios de cultura utilizados

Reagentes e Meios de Cultura	Marca
Pirofosfato de sódio	Merk
Tween 80	Merk
Glifosato (48% glifosato; 38% ácido de glifosato)	Nufarm
NaCl	Vetec
Cristal Violeta	Vetec
Safranina	Merk
Iodeto de potássio	Merk
Iodo cristalizado	Merk
Acetona	Vetec
Alcool 95%	Vetec
Ágar TSA	Difco
Ágar MacConkey	Difco
Ágar Mueller-Hinton	Difco
BaCl ₂ .2H ₂ O	Merck
H ₂ SO ₄	Vetec
NaOH pastilha	Dinamica
HCl 37%	Vetec

Fonte: elaborado pelo autor

4.2 Preparo de soluções e meios de cultura

Todas as soluções, meios de cultura e vidrarias foram previamente esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Todos os meios de cultura foram preparados de acordo com as especificações do fabricante e tiveram seus pHs ajustados entre 7,4-7,5 com solução de NaOH ou HCl 10%.

4.2.1 Solução de desagregação enriquecida com glifosato

A solução de desagregação foi preparada em triplicata de acordo com as indicações de Cunha e Batista (2014). Resumidamente, foram diluídos 0,18 g de pirofosfato de sódio, 0,18 mL de Tween 80 e 1,53 g de NaCl em 174,6 mL de H₂O destilada. Foram acrescentadas pérolas de vidro na solução para auxiliar a desagregação dos microrganismos presentes no solo. Após, foram acrescentados 5,4 mL de solução comercial de glifosato previamente filtrada em filtro de seringa (0,22 µm x 30 mm, PES; Kasvi), originando uma solução final com cerca de 2,5% de glifosato. Tal concentração foi escolhida baseando-se nos valores predominantes de diluição do glifosato recomendados por diferentes fabricantes do herbicida para aplicação em cultivos (DEFARGE *et. al.* 2018). A solução enriquecida de glifosato tem como função agir seletivamente na extração das bactérias, eliminando aquelas que não são resistentes ao composto.

4.2.2 Solução salina 0,85%

Esta solução foi utilizada para se realizar a diluição seriada. Foram pesados 1,14 g de NaCl e dissolvidos em 135 mL de água destilada. Cada tubo, de um total de quinze tubos de ensaio, foi preenchido com 9 mL da solução obtida e levados para esterilização, sendo armazenados até o dia da diluição.

4.2.3 Solução padrão de McFarland 0,5

Esta solução foi utilizada como controle de turbidez para padronização do inóculo no teste de sensibilidade a antimicrobianos e foi preparada conforme o CLSI (2016). Uma alíquota de 0,5 mL de BaCl₂ 0.048 mol/L (1,175% w/v BaCl₂ • 2H₂O) foi adicionada a 99,5 mL de H₂SO₄ 0,18 mol/L (1% v/v), sendo homogeneizada constantemente para manter a suspensão. A densidade correta do controle de turbidez foi verificada usando-se o espectrofotômetro com fonte de luz de 1-cm e cubeta apropriada. A absorbância da solução

padrão variou de 0,08 a 0,10 quando observada no comprimento de onda de 625 nm.

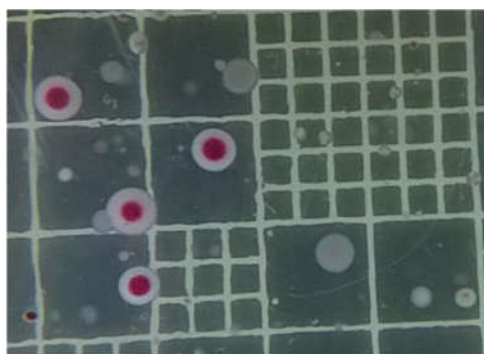
4.2.4 *Ágar McConkey*

Este meio foi utilizado para o cultivo das bactérias extraídas do solo. 15 g do meio foram pesados e transferidos para um erlenmeyer contendo 300 mL de água destilada. O meio foi esterilizado e depois armazenado em geladeira até o dia da coleta.

O Ágar MacConkey foi escolhido por ser um meio de cultura utilizado para isolamento seletivo de bactérias Gram Negativas, devido à presença de cristal violeta e sais biliares em sua formulação. Além disto, contém lactose, peptona e um indicador de pH, o corante vermelho de toluileno. Logo, bactérias fermentadoras de lactose (Lac +) produzem ácido que baixa o pH do meio a valores inferiores a 6,8, resultando em colônias roxas, rosadas ou vermelhas (Figura 3). Bactérias incapazes de fermentar lactose (Lac –) utilizam a peptona disponível, formando amônia e elevando o pH, o que resulta na formação de colônias brancas ou sem coloração (MACCONKEY, 1905 e 1908).

Segundo o “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” (GARRITY *et. al.* 2002) são gêneros de bactérias Lac + a *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Serratia* e são exemplos de Lac – a *Acinetobacter*, *Salmonella*, *Proteus*, *Shigella*, *Yersinia*, *Providencia* e *Morganella*.

Figura 3. Crescimento de bactérias em ágar MacConkey



Colônias de bactérias Lac +: centro roxo avermelhado; Lac – : sem coloração/brancas.

Fonte: o autor

4.2.5 *Ágar TSA enriquecido com glifosato*

Este meio foi utilizado para manutenção/estocagem das cepas isoladas. 10,8 g de meio TSA foram pesados e diluídos em 270 mL de H₂O destilada. Após esterilização, foram acrescentados 2,7 mL de solução comercial de glifosato previamente filtrada em filtro de seringa como no item 4.2.1, originando uma solução enriquecida com aproximadamente 0,85% de glifosato. Cada tubo de ensaio, previamente esterilizado, foi preenchido com 3 mL do meio obtido e semeado com a bactéria isolada, sendo mantido em BOD a 20° C. Uma quantidade menor de glifosato foi adicionada a este meio prevendo-se que algumas das bactérias resistentes podem se tornar dependentes deste substrato como fonte de nitrogênio e fósforo.

4.2.6 *Meios de cultura usados no antibiograma*

Para os antibiogramas utilizou-se 38 g de Ágar Mueller-Hinton para 1 l de água destilada; ágar TSA normal em uma proporção de 40 g por litro de água destilada; e solução salina 0,85% para calibração do inóculo.

4.3 Caracterização morfotintorial dos isolados

A coloração de Gram é usada para classificar bactérias com base no tamanho, morfologia celular e comportamento diante dos corantes. As soluções e modo de proceder foram realizados de acordo com as indicações de Levy (2004):

- Cristal violeta 1% (solução estoque): 1 g de cristal violeta para 100 mL de água destilada;
- Lugol (mordente): 3,34 g de iodo cristalizado + 6,67 g de iodeto de potássio diluídos em 1000 mL de água destilada;
- Alcool/Acetona 1:1 (descolorante): 500 mL de acetona diluídos em 500 mL de álcool etílico 95%;
- Safranina 0,25% (contracorante): 2,5 g de safranina + 100 mL de álcool etílico 95%. Após, completou-se o volume para 1000 mL com água destilada.

As bactérias estocadas em TSA enriquecido com glifosato foram fixadas em lâminas de microscópio e então mergulhadas em sequência nas soluções de cristal violeta, lugol, álcool/acetona e safranina e depois observadas ao microscópio. As bactérias Gram-

positivas retêm o cristal-violeta e se apresentam com coloração violeta enquanto as Gram-negativas são descoradas pelo álcool-acetona, sendo, portanto, coradas com o contracorante e se apresentam róseas.

4.4 Equipamentos utilizados

Tabela 3. Lista de equipamentos utilizados

Equipamento	Marca	País de fabricação
Estufa para cultura Orion 502	Fanem	Brasil
Incubadora shaker TE-420	Tecnal	Brasil
Espectrofotômetro Biomate 3 UV-VIS	Thermo	EUA
Balança de precisão B-TEC-210A	Tecnal	Brasil
Forno mufla Microprocessado Q318M	Quimis	Brasil
Peneiras granulométricas 8''	SPLabor	Brasil
Agitador eletromagnético de peneiras	Lab1000	Brasil
pHmetro digital HI2210-01	Hanna	EUA
	Instruments	
BOD TE-371	Tecnal	Brasil
Autoclave AV75	Phoenix	Brasil
Micropipetas LabMate Pro	LabMate	Reino Unido
Contador de colônias mecânico CP602	Phoenix	Brasil

Fonte: elaborado pelo autor

4.5 Procedimento de coleta

Foi realizada uma coleta no dia 12/09/2018, durante a estação seca, em três locais previamente selecionados no município de Eusébio-CE correspondendo a dois diferentes sistemas de manejo agrícola e uma amostra de solo não manejado e sem cultivo. Os sítios de amostragem foram georreferenciados posteriormente com o auxílio do *software* Google Earth Pro, apresentando as seguintes coordenadas:

A1 - Manejo Alternativo (agroecológico): 3°51'29.14"S / 38°25'6.59"O;

A2 - Solo não manejado sem cultivo: 3°51'31.87"S / 38°25'6.16"O;

A3 - Manejo Convencional: 3°50'17.55"S / 38°26'30.60"O.

As características específicas referentes a cada forma de manejo do solo foram obtidas por meio de observações no local da coleta e de dados fornecidos pelos proprietários.

Nos solos A1 e A2, a coleta ocorreu conforme literatura (FRIZOLA *et al.*, 2006), sendo realizada amostragem aleatória simples composta de cinco sub-amostras coletadas entre 0 e 10 cm de profundidade em uma área de aproximadamente 20 m², objetivando representar ao máximo a variabilidade de condições presente em cada uma das áreas de coleta. No solo A3, foram coletadas cinco sub-amostras, cada uma em canteiros contendo plantações diferentes, escolhidos aleatoriamente e na profundidade entre 0 a 10 cm.

O material coletado foi colocado em sacos plásticos tipo ziplock e acondicionados em um isopor fechado para transporte até o laboratório.

4.6 Extração, contagem e isolamento das bactérias Gram negativas resistentes ao glifosato

As cinco sub amostras de cada tipo de solo foram reunidas num só saco plástico e agitadas manualmente e vigorosamente dentro do saco para serem homogeneizadas. 20 gramas de cada amostra de solo foram pesados em frascos de vidro previamente esterilizados e transferidos para os frascos contendo a solução de desagregação com pérolas. Estes foram colocados em incubadora shaker sob agitação a 150 RPM por 30 minutos à temperatura de 37° C. Após a incubação das amostras, uma alíquota de 1 mL foi retirada de cada frasco para iniciar as diluições seriadas, considerando a amostra inicial incubada como a primeira diluição com concentração de 10⁻¹. As diluições posteriores (10⁻² a 10⁻⁵) foram feitas em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina estéril conforme preparados no item 4.2.2.

Em seguida, uma alíquota de 1 mL de cada diluição foi transferida, em duplicata, para placas de Petri e, após, foi derramado ágar MacConkey conforme a técnica de *pour plate*, onde se deposita o meio de cultura sobre o inóculo e agita-se meticulosamente a mistura para permitir o espalhamento e crescimento das bactérias sobre e sob a superfície do meio de cultura (SANDERS, 2012). As placas foram incubadas por 48 horas à temperatura de 35° C. Após, realizou-se a contagem das colônias, expressa pela média aritmética das duplicatas, que se apresentaram dentro do intervalo entre 25 a 250 colônias, em unidade formadora de

colônias (UFC). As bactérias foram isoladas transferindo-se porções de cada colônia para tubos contendo meio TSA enriquecido com glifosato, preparado conforme item 4.2.5.

4.7 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos (antibiograma)

A suscetibilidade dos isolados aos antibióticos escolhidos (vide **Tabela 5**) foi avaliada pelo método do disco-difusão em ágar de acordo com Bauer-Kirby (1966), seguindo as recomendações propostas pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2016) como descrito a seguir:

As cepas armazenadas em TSA enriquecido com glifosato, porções superficiais de pelo menos três colônias de cada tubo, foram transferidas com o auxílio de alça microbiológica de níquel-cromo para tubos contendo ágar TSA normal, onde foram incubadas por 24 horas a 35 °C. Após, quantidade suficiente de colônia crescida foi transferida para tubos contendo 9 mL de solução salina 0,85%, e o conteúdo agitado manual e vigorosamente, para a padronização de densidade de cada inóculo, em comprimento de onda a 625 nm, de modo a se obter entre 1 a 2×10^8 UFC/mL. Um swab estéril foi utilizado para embeber porções de cada inóculo, o qual foi em seguida semeado sobre toda a superfície da placa contendo Ágar Mueller-Hinton. Após, os discos de antibiótico foram depositados sobre o meio com auxílio de pinças estéreis. As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 24 horas. Após esse intervalo, os halos de inibição foram medidos com o auxílio de um paquímetro e interpretados de acordo com os parâmetros especificados na Tabela 4.

Tabela 4. Padrões interpretativos de diâmetros de halos de inibição para *Enterobacteriaceae*

Antibiótico	Diâmetros dos halos de inibição (mm)			Referência
	R ≤	I	S ≥	
Ampicilina	13	14-16	17	CLSI (2016)
Ciprofloxacina	15	16-20	21	CLSI (2016)
Cloranfenicol	12	13-17	18	CLSI (2016)
Ertapenem	15	16-18	19	CLSI (2016)
Eritromicina*	11	11,01-11,99	12	Andrews (2009)
Gentamicina	12	13-14	15	CLSI (2016)
Estreptomicina	11	12-14	15	CLSI (2016)
Tetraciclina	14	15-18	19	CLSI (2016)

R = Resistente; I = Resistência intermediária; S = Suscetível. *Para eritromicina usou-se o parâmetro de *Neisseria*, devido não haver teste deste antibiótico para Enterobacteriaceae. Fonte: elaborado pelo autor

Porém, após a identificação das bactérias isoladas, novos parâmetros de interpretação deverão ser considerados conforme a família, gênero ou espécie das mesmas (ANDREWS, 2009).

Tabela 5. Lista de antibióticos testados

Antibiótico	Classe	Mecanismo de ação	Concentração do disco (µg)	Fabricante
Ampicilina	β-lactâmico penicilínico	Inibição síntese de parede celular em não produtores de β-lactamase	10	CECON
Ciprofloxacina	Fluoroquinolona	Inibição da DNA-girase	5	CECON
Cloranfenicol	Fenicol	Inibição de síntese proteica a nível ribossômico (50S)	30	Laborclin
Ertapenem	β-lactâmico carbapênico	São resistentes à β-lactamase	10	CECON
Eritromicina	Macrolídeo	Inibição de síntese proteica a nível ribossômico (SOB)	15	Laborclin
Gentamicina	Aminoglicosídeo	Inibição de síntese proteica a nível ribossômico	10	CECON
Estreptomicina	Aminoglicosídeo	Inibição de síntese proteica a nível ribossômico (30S)	10	Laborclin
Tetraciclina	Tetraciclina	Inibição de síntese proteica a nível ribossômico (30S)	30	CECON

Como controle positivo do teste utilizou-se a cepa de *E. coli* ATCC 25922 da bacterioteca do LABOMAR.

A escolha dos antibióticos cloranfenicol, ciprofloxacina, ampicilina e tetraciclina se deu com base em relato na literatura sobre bactérias que apresentaram mudanças na resposta a estes antibióticos após serem tratadas com doses subletais de glifosato e outros pesticidas (KURENBACH et al., 2015).

Ampicilina e ertapenem foram selecionados ao teste devido a resistência cruzada entre penicilina G, um β-lactâmico, e o glifosato verificada em bactérias de raízes de plantas tratadas com o antibiótico (SHIN *et. al.*, 2016). Além disto, a resistência de bactérias Gram

negativas à eritromicina, ciprofloxacina, aminoglicosídeos, cloranfenicol e várias outras drogas está associada à presença de bombas de efluxo em sua parede celular, funcionando como um indicativo que esse mecanismo de resistência possa estar atuando nas cepas testadas (LI *et. al.*, 2015, BLANCO *et. al.*, 2016).

Depois de obtidos os resultados dos antibiogramas, o índice de múltipla resistência a antimicrobianos (MAR) foi determinado pela razão entre o número de antibióticos ao qual a cepa demonstrou resistência e o número total de antibióticos testados, multiplicado por 100 para obtenção dos resultados em percentual (VASCONCELOS *et. al.*, 2010).

4.8 Caracterização das amostras de solo

Como foi mencionado no item 2.2.1, as propriedades físicas do solo são determinantes no comportamento do glifosato nesta matriz ambiental. Desse modo, a caracterização física dos solos é uma importante ferramenta na avaliação dos resultados obtidos no presente trabalho.

Os ensaios de granulometria e matéria orgânica foram realizados no Laboratório de Oceanografia Geológica (LOG) do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará.

4.8.1 Granulometria

Para esta caracterização, o método de peneiração foi empregado. Após a homogeneização das sub-amostras (vide item 4.6), 200 g de cada tipo de solo foram secos em estufa a 60 °C por 24 horas. Após, 100 g de cada amostra de solo foram pesados e submetidos à peneiração em série em peneiras de 8 polegadas com aberturas de 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,062 mm, seguindo a metodologia de Folk e Ward (1957), onde os solos são classificados de acordo com o percentual predominante de seus componentes: cascalho, areia, argila e silte obtidos pelo seu diâmetro granulométrico.

De acordo com o tamanho de suas partículas, os solos arenosos são subdivididos em:

- Areia grossa: granulometria de 2 a 0,5 mm;
- Areia média: granulometria de 0,49 a 0,25 mm;

- Areia fina: granulometria de 0,24 a 0,062 mm.

4.8.2 Teor de matéria orgânica

A determinação da matéria orgânica total foi obtida pelo método gravimétrico a partir da combustão de 2 g da amostra de cada tipo de solo seco em forno mufla, em duplicata, à temperatura de 450 °C por 24 horas (LORING E RANTALA, 1992).

O teor de matéria orgânica foi obtido por meio da equação:

$$M_o = \frac{M_c \times 100}{M_s}$$

Onde:

Mo = Teor de matéria orgânica;

Mc = Massa perdida após calcinação;

Ms = Massa total de sedimento.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos solos coletados

A seguir estão relatadas as práticas agrícolas aplicadas em cada local de coleta de acordo com as informações obtidas pelos proprietários e durante as observações em campo:

- Solo de manejo alternativo agroflorestal (Figura 4): Solo com cultivo agroflorestal a partir de 2014, porém sem histórico de cultivos anteriores. Ambiente cercado, mas com presença de animais domésticos ao redor. Solo originalmente pobre, porém, suplementado com composto orgânico oriundo da compostagem, esterco de galinha obtido de granjas de criação comercial e fosfato de rocha, um produto comercial utilizado para suplementação mineral do solo. Irrigado por água bombeada de poço existente na propriedade.
- Solo não manejado: Solo com presença de animais domésticos (gatos e cães), inclusive de suas fezes. Local utilizado pelo proprietário para empilhamento de galhos, folhas e outros materiais orgânicos provenientes da limpeza da propriedade.
- Solo de manejo convencional (Figura 5): Terreno subdividido em canteiros com cerca de 10 m² destinados cada um a um cultivo específico. Culturas de pimentão, coentro,

cebolinha, quiabo, mandioca, feijão e batata doce. Utilização de esterco bovino e esterco de galinha como fertilizantes. A irrigação é feita utilizando água bombeada de poço e de uma cisterna escavada nos arredores dos cultivos. Foi observada a utilização de glifosato na propriedade durante uma das visitas exploratórias, além de utilização de compostos inseticidas para combate de pragas do feijão, como informado diretamente pelo proprietário.

Figura 4. Sítio de manejo agroflorestal



Fonte: o autor

Figura 5. Sítio de manejo convencional



Fonte: o autor

Segundo a metodologia de Folk e Ward (1957), os solos das amostras A1 e A3, por apresentarem grande teor de areia com grânulos de 0,49 a 0,25 mm foram classificados como areia média (vide Tabela 6) enquanto a amostra A2 foi classificada como areia fina. O solo A1 apresentou o maior teor de matéria orgânica o que, segundo Simonsen e colaboradores (2008), contribui para uma mais rápida degradação do agrotóxico. Enquanto que o solo A2 apresentou maior teor de argila, fator que contribui para a retenção do glifosato por mais tempo, aumentando a sua meia vida no solo (BERGSTROM *et. al.* 2011).

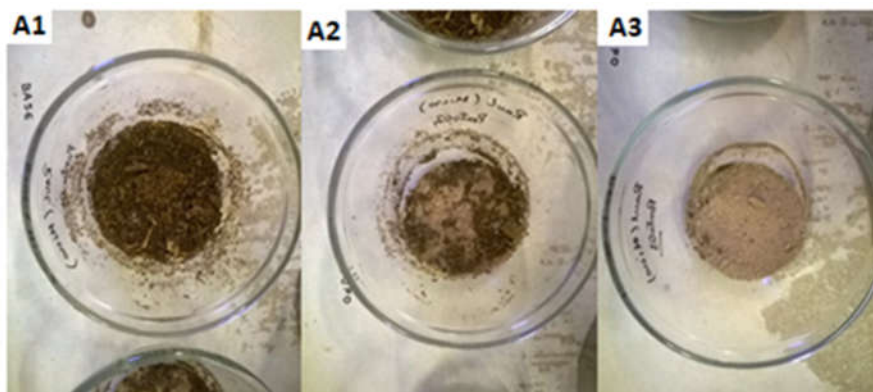
Tabela 6. Resultados da caracterização física dos solos estudados

Amostra	Cascalho (%)	Areia (%)	Silte (%)	Argila (%)	Teor de matéria orgânica (%)
A1 (Solo agroflorestral)	1,68	90,47	0,23	7,63	15,17
A2 (Solo não manejado)	0,66	87,68	0,17	11,50	3,20
A3 (Solo de manejo convencional)	0,58	91,54	0,19	7,69	1,31

Fonte: elaborado pelo autor

A Figura 6 mostra os três tipos de solo antes dos procedimentos de secagem, peneiração granulométrica e incineração.

Figura 6. Amostras de solo agroflorestral (A1), não cultivado (A2) e de manejo convencional (A3)



Fonte: o autor

5.2 Contagem padrão em placas e caracterização morfológica dos isolados

Após os procedimentos de extração, diluição e incubação em placas contendo ágar MacConkey, as colônias formadas foram quantificadas (Figura 7). Foi observado que a amostra A3 apresentou um crescimento bacteriano resistente ao glifosato dez vezes menor e o solo A2 1000 vezes menor do que a amostra de solo agroflorestral (Tabela 7).

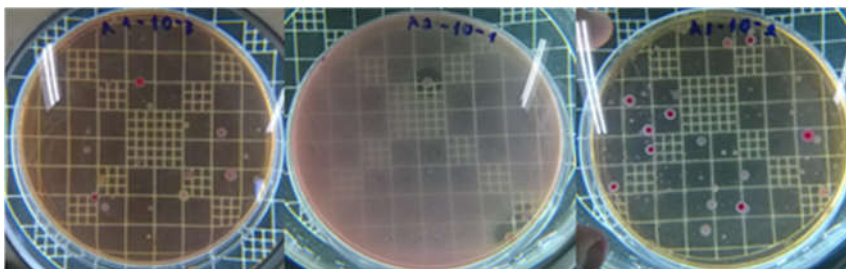
Tabela 7. Contagem de bactérias resistentes ao glifosato crescidas em ágar MacConkey

Amostra	UFC/g de solo
A1 (Solo agroflorestral)	$1,6 \times 10^5$
A2 (Solo não manejado)	$1,0 \times 10^2$
A3 (Solo de manejo convencional)	$5,6 \times 10^4$

UFC: unidade formadora de colônia

Fonte: elaborado pelo autor

Figura 7. Contagem das colônias bacterianas crescidas em ágar MacConkey



Fonte: o autor

O grande número de cepas resistentes ao glifosato isoladas no solo de manejo convencional já era esperado, pois a exposição contínua a agrotóxicos acarreta pressão capaz de selecionar as populações bacterianas existentes no ambiente que foram capazes de desenvolver mecanismos para se desintoxicarem daqueles agentes (WEBBER et. al. 2015; RANGASAMY et. al. 2018; KURENBACH et. al. 2018), viabilizando sua sobrevivência na presença do herbicida adicionado na solução de extração e no meio McConkey. O solo sem manejo, por não sofrer exposição direta ou indireta a agrotóxicos, apresentou uma microbiota pouco adaptada ao glifosato a qual cresceu em menor número nas placas, após passar pelo choque seletivo. No entanto, foi surpreendente o número de cepas resistentes ao glifosato

isoladas da agrofloresta já que, teoricamente, seu manejo não implica o uso de qualquer agrotóxico. Uma das possíveis causas da elevada contagem poderia ser o esterco de galinha usado para suplementar os nutrientes do solo, pois várias granjas utilizam antibióticos tanto para profilaxia quanto para o tratamento de doenças das aves de forma indiscriminada, o que pode causar o surgimento de cepas resistentes aos antibióticos e, conseqüentemente, resistência cruzada ao glifosato quando expostas a este agrotóxico (BEZERRA *et. al.* 2017). Outra hipótese seria a contaminação do solo agroflorestral por água contendo traços de glifosato e/ou bactérias resistentes oriundos da lixiviação destes pelo solo arenoso, o que acarretaria a maior expressão de cepas resistentes ao herbicida. O uso de glifosato em outros cultivos da região pode levar à contaminação das águas subterrâneas que, ao serem utilizadas na irrigação, como foi o caso, contaminam o solo local (OSTEN e DZUL-CAAMAL, 2017; SANCHÍS *et. al.* 2012, VAN STEMPOORT *et. al.* 2014). Entretanto, essa hipótese só poderia ser confirmada após análises da água utilizada para irrigação e do solo coletado por meio de ensaios específicos para detecção do agrotóxico e de seus produtos de degradação presentes nas amostras.

Após a contagem, as colônias foram isoladas em tubos de ensaio contendo meio TSA enriquecido com glifosato. Foram isoladas 30, 12 e 30 colônias dos solos A1, A2 e A3 respectivamente. Dos isolados de A1, 27 se mostraram viáveis no meio enriquecido com glifosato, conforme pode ser observado na Tabela 8. Da amostra A3, foram obtidos 26 isolados viáveis (Tabela 9), enquanto que dos 12 isolados da amostra A2, somente cinco foram viáveis no meio de cultura utilizado (Tabela 10).

Devido o isolamento ter sido direcionado para o crescimento de enterobactérias (ágar McConkey), a técnica de coloração de Gram corroborou que as bactérias isoladas nos três tipos de solo pertenciam ao grupo Gram negativas (vide Tabela 8, Tabela 9 e Tabela 10), ou seja, por possuírem uma camada mais fina de peptidoglicanos, apresentam uma parede celular mais fina que não consegue reter o corante violeta de metila e, por isto, são coradas pela safranina. Além disto, tanto a morfologia das células quanto a sua capacidade de fermentação de lactose foi definida.

Tabela 8. Caracterização morfotintorial dos isolados de bactérias provenientes do solo agroflorestral

Cepa	Coloração de Gram	Morfologia	Fermentação da Lactose
P1	Negativa (-)	Bastonetes	Lac -
P2	Negativa (-)	Bastonetes	Lac +
P4	Negativa (-)	Bastonetes	Lac +
P5	Negativa (-)	Bastonetes	Lac +
P6	Negativa (-)	Cocos	Lac +
P7	Negativa (-)	Bastonetes	Lac -
P8	Negativa (-)	Bastonetes curtos	Lac +
P9	Negativa (-)	Cocos	Lac +
P10	Negativa (-)	Bastonetes	Lac -
P11	Negativa (-)	Bastonetes	Lac -
P12	Negativa (-)	Bastonetes longos	Lac -
P14	Negativa (-)	Bastonetes	Lac -
P15	Negativa (-)	Bastonetes	Lac +
P16	Negativa (-)	Bastonetes	Lac -
P17	Negativa (-)	Bastonetes	Lac +
P18	Negativa (-)	Bastonetes	Lac +
P20	Negativa (-)	Bastonetes	Lac -
P21	Negativa (-)	Bastonetes	Lac +
P22	Negativa (-)	Bastonetes curtos	Lac -
P23	Negativa (-)	Bastonetes	Lac -
P24	Negativa (-)	Bastonetes	Lac -
P25	Negativa (-)	Bastonetes	Lac -
P26	Negativa (-)	Bastonetes	Lac -
P27	Negativa (-)	Bastonetes	Lac -
P28	Negativa (-)	Bastonetes	Lac -
P29	Negativa (-)	Bastonetes longos	Lac -
P30	Negativa (-)	Bastonetes	Lac -

Fonte: elaborado pelo autor

Tabela 9. Caracterização morfotintorial dos isolados de bactérias provenientes do solo não cultivado

Cepa	Coloração de Gram	Morfologia	Fermentação de Lactose
S1	Negativa (-)	Bastonetes	Lac -
S4	Negativa (-)	Bastonetes	Lac +
S6	Negativa (-)	Bastonetes	Lac +
S10	Negativa (-)	Bastonetes	Lac +
S11	Negativa (-)	Bastonetes	Lac +

Fonte: elaborado pelo autor

Tabela 10. Caracterização morfotintorial dos isolados de bactérias provenientes do solo de manejo convencional

Cepa	Coloração de Gram	Morfologia	Fermentação de Lactose
C1	Negativa (-)	Bastonetes	Lac +
C3	Negativa (-)	Bastonetes	Lac +
C5	Negativa (-)	Bastonetes	Lac +
C7	Negativa (-)	Bastonetes	Lac +
C8	Negativa (-)	Bastonetes	Lac -
C9	Negativa (-)	Bastonetes	Lac -
C10	Negativa (-)	Bastonetes longos	Lac +
C11	Negativa (-)	Bastonetes	Lac +
C13	Negativa (-)	Bastonetes	Lac +
C14	Negativa (-)	Bastonetes	Lac +
C15	Negativa (-)	Bastonetes longos	Lac -
C16	Negativa (-)	Bastonetes	Lac -
C17	Negativa (-)	Bastonetes	Lac +
C18	Negativa (-)	Bastonetes	Lac -
C19	Negativa (-)	Bastonetes	Lac +
C20	Negativa (-)	Bastonetes curtos	Lac +
C21	Negativa (-)	Bastonetes	Lac -
C22	Negativa (-)	Bastonetes	Lac +
C23	Negativa (-)	Bastonetes	Lac -
C24	Negativa (-)	Bastonetes	Lac +
C25	Negativa (-)	Bastonetes	Lac -

Tabela 10. Caracterização morfotintorial dos isolados de bactérias provenientes do solo de manejo convencional

Cepa	Coloração de Gram	Morfologia	Fermentação de Lactose
C26	Negativa (-)	Bastonetes curtos	Lac -
C27	Negativa (-)	Bastonetes	Lac +
C28	Negativa (-)	Bastonetes	Lac +
C29	Negativa (-)	Bastonetes	Lac +
C30	Negativa (-)	Bastonetes	Lac +

Fonte: elaborado pelo autor

5.3 Antibiograma

Após incubação dos isolados em meio Mueller Hinton contendo os discos de antibióticos em teste, os halos de inibição foram medidos e os valores interpretados de acordo com os parâmetros da Tabela 4. Os isolados apresentaram perfis variados de resistência aos antibióticos conforme demonstrado na Tabela 11, Tabela 12 e Tabela 13.

Tabela 11. Resultados do antibiograma das cepas isoladas do solo de agrofloresta

Cepa	Amp	Gen	Clo	Tet	Cip	Ert	Est	Eri
P1	0 R	23,53 S	0 R	17,25 I	31,79 S	15,95 I	24,49 S	14,51 S
P2	17,00 S	25,95 S	28,13 S	22,64 S	36,71 S	38,02 S	23,27 S	20,26 S
P4	16,32 I	25,85 S	31,75 S	21,97 S	35,94 S	34,09 S	21,27 S	18,6 S
P5	14,39 I	25,91 S	24,97 S	16,50 I	39,59 S	35,19 S	21,13 S	0 R
P6	0 R	24,78 S	26,79 S	9,75 R	33,83 S	33,30 S	22,15 S	11,99 I
P7	0 R	26,12 S	12,95 I	18,47 I	29,28 S	22,32 S	19,32 S	17,44 S
P8	0 R	27,86 S	8,71 R	17,50 I	35,33 S	20,46 S	23,54 S	13,47 S
P9	0 R	30,41 S	15,09 I	15,20 I	33,38 S	26,72 S	24,74 S	12,10 I
P10	0 R	28,34 S	0 R	17,71 I	33,44 S	19,39 S	27,19 S	10,98 R
P11	0 R	25,34 S	0 R	19,07 S	36,95 S	18,30 I	22,22 S	12,72 I
P12	0 R	22,61 S	26,15 S	21,13 S	38,58 S	30,99 S	23,03 S	12,45 I
P14	0 R	26,27 S	15,95 I	20,03 S	34,26 S	18,91 I	21,73 S	14,75 S
P15	0 R	23,09 S	0 R	16,74 I	29,69 S	16,65 I	17,41 S	17,08 S
P16	0 R	28,74 S	11,22 R	20,95 S	29,83 S	19,72 S	23,86 S	21,75 S
P17	0 R	25,2 S	0 R	19,19 S	30,86 S	18,55 I	23,45 S	17,16 S
P18	26,44 S	26,67 S	29,05 S	24,22 S	39,21 S	37,59 S	23,79 S	18,51 S

Tabela 11. Resultados do antibiograma das cepas isoladas do solo de agrofloresta

Cepa	Amp	Gen	Clo	Tet	Cip	Ert	Est	Eri
P20	19,95 S	25,11 S	34,50 S	23,71 S	33,02 S	37,22 S	19,07 S	11,73 I
P21	0 R	26,42 S	19,99 S	10,59 R	36,29 S	17,71 I	24,04 S	16,98 S
P22	0 R	26,23 S	11,05 R	18,69 I	32,29 S	20,21 S	23,89 S	10,33 R
P23	0 R	25,53 S	14,85 I	0 R	27,85 S	19,91 S	21,8 S	13,13 S
P24	0 R	27,56 S	9,03 R	19,53 S	31,89 S	19,06 S	26,28 S	12,39 I
P25	0 R	24,01 S	25,04 S	21,78 S	39,57 S	32,49 S	20,70 S	13,54 S
P26	0 R	23,62 S	10,42 R	20,35 S	29,20 S	16,04 I	19,58 S	0 R
P27	0 R	21,85 S	0 R	15,05 I	28,94 S	11,83 R	8,35 R	0 R
P28	13,69 I	23,47 S	25,13 S	18,71 I	34,90 S	34,03 S	16,81 S	9,77 R
P29	0 R	26,35 S	18,07 S	23,19 S	30,54 S	13,55 R	18,98 S	7,50 R
P30	0 R	24,30 S	0 R	19,25 S	28,14 S	16,29 I	17,78 S	8,34 R

OBS: R = resistente; I = resistência intermediária; S = suscetível. Amp = ampicilina; Gen = gentamicina; Clo = cloranfenicol; Tet = tetraciclina; Cip = ciprofloxacina; Ert = ertapenem; Est = estreptomicina; Eri = eritromicina. Halos medidos em milímetro.

Fonte: elaborado pelo autor

Tabela 12. Resultado do antibiograma das cepas isoladas do solo não cultivado

Cepa	Amp	Gen	Clo	Tet	Cip	Ert	Est	Eri
S1	10,42 R	25,41 S	30,99 S	22,01 S	39,21 S	37,34 S	23,00 S	15,71 S
S4	0 R	18,83 S	10,88 R	16,28 I	30,41 S	16,32 I	12,55 I	0 R
S6	0 R	28,85 S	15,73 I	20,62 S	31,54 S	29,43 S	22,43 S	10,60 R
S10	0 R	24,49 S	32,18 S	23,67 S	26,32 S	27,08 S	16,43 S	10,20 R
S11	12,66 R	25,2 S	36,85 S	27,86 S	51,34 S	40,24 S	25,89 S	21,87 S

OBS: R = resistente; I = resistência intermediária; S = suscetível. Amp = ampicilina; Gen = gentamicina; Clo = cloranfenicol; Tet = tetraciclina; Cip = ciprofloxacina; Ert = ertapenem; Est = estreptomicina; Eri = eritromicina. Halos medidos em milímetro.

Fonte: elaborado pelo autor

Tabela 13. Resultado do antibiograma das cepas isoladas do solo de manejo convencional

Cepa	Amp	Gen	Clo	Tet	Cip	Ert	Est	Eri
C1	0 R	24,72 S	36,29 S	26,27 S	28,41 S	26,05 S	18,72 S	21,31 S
C3	0 R	20,97 S	30,26 S	21,15 S	28,31 S	25,10 S	15,96 S	10,42 R
C5	0 R	21,90 S	31,22 S	22,33 S	30,24 S	33,92 S	19,52 S	10,01 R
C7	0 R	23,51 S	29,42 S	24,53 S	32,89 S	29,98 S	16,22 S	13,62 S
C8	0 R	0 R	25,75 S	9,54 R	23,58 S	0 R	0 R	11,11 I
C9	21,48 S	20,92 S	34,24 S	29,74 S	44,34 S	37,47 S	21,50 S	9,57 R
C10	0 R	25,57 S	31,62 S	0 R	18,40 I	34,01 S	19,67 S	9,93 R
C11	0 R	21,96 S	8,83 R	8,63 R	28,04 S	38,02 S	18,55 S	19,54 S
C13	0 R	25,75 S	33,14 S	20,51 S	29,87 S	22,88 S	16,16 S	9,91 R
C14	0 R	13,95 I	30,85 S	33,34 S	33,89 S	31,89 S	20,57 S	11,05 I
C15	0 R	24,85 S	8,12 R	15,03 I	25,82 S	30,17 S	0 R	16,58 S
C16	0 R	21,04 S	26,57 S	0 R	22,84 S	35,23 S	23,56 S	16,06 S
C17	7,43 R	20,56 S	0 R	0 R	21,70 S	31,81 S	14,32 I	12,85 S
C18	0 R	26,00 S	20,62 S	19,14 S	30,94 S	17,84 I	0 R	0 R
C19	8,51 R	21,68 S	30,27 S	20,03 S	31,69 S	29,74 S	17,36 S	10,29 R
C20	0 R	20,07 S	26,58 S	19,34 S	34,16 S	31,47 S	17,03 S	8,49 R
C21	0 R	26,35 S	34,39 S	27,25 S	38,81 S	33,68 S	20,81 S	13,48 S
C22	0 R	22,57 S	30,13 S	0 R	20,14 I	31,88 S	18,55 S	12,14 S
C23	20,89 S	21,84 S	31,82 S	28,88 S	43,21 S	37,85 S	23,00 S	9,66 R
C24	0 R	15,68 S	0 R	0 R	28,07 S	32,57 S	13,27 I	11,59 I
C25	0 R	15,65 S	0 R	0 R	26,64 S	30,55 S	13,78 I	11,81 I
C26	0 R	19,68 S	0 R	17,53 I	36,45 S	18,23 I	17,14 S	0 R
C27	0 R	13,50 I	0 R	0 R	28,33 S	20,46 S	13,20 I	12,14 I
C28	0 R	28,06 S	37,70 S	0 R	29,47 S	31,87 S	20,12 S	14,16 S
C29	9,34 R	23,04 S	27,97 S	20,53 S	29,68 S	33,30 S	18,09 S	8,81 R
C30	8,57 R	21,99 S	31,54 S	22,67 S	32,30 S	32,90 S	15,52 S	8,75 R

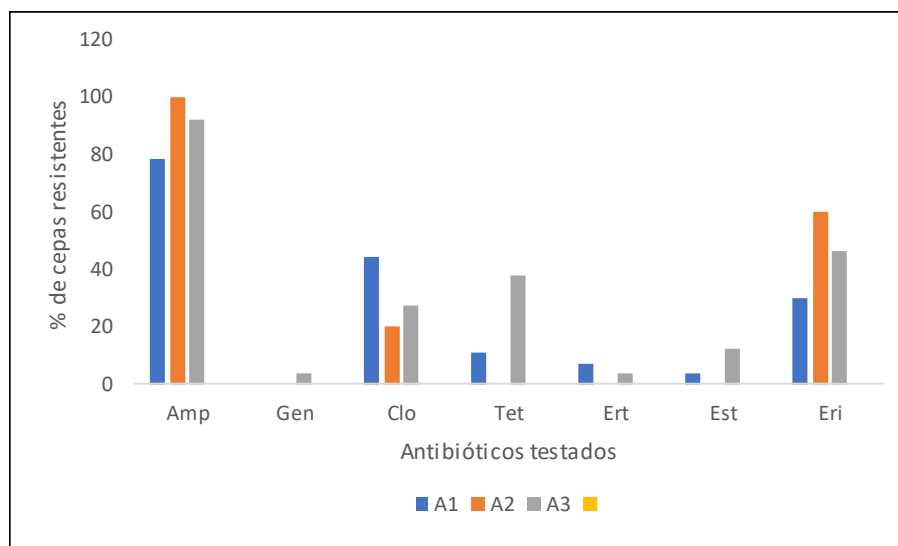
OBS: R = resistente; I = resistência intermediária; S = suscetível. Amp = ampicilina; Gen = gentamicina; Clo = cloranfenicol; Tet = tetraciclina; Cip = ciprofloxacina; Ert = ertapenem; Est = estreptomicina; Eri = eritromicina. Halos medidos em milímetro.

Fonte: elaborado pelo autor

Constatou-se que das 58 cepas isoladas, 54 apresentaram resistência a pelo menos um dos antibióticos testados e 50 foram resistentes à AMP, representando 86% do total (ver

Gráfico 2). Korb (2014) verificou que 100% das cepas de *E. coli* isoladas de fezes de frangos provenientes de criação intensiva apresentaram resistência à AMP, o que corrobora uma de nossas hipóteses de que as bactérias resistentes a este antibiótico presentes nos solos estudados sejam oriundas do esterco de galinha, tendo sido cosseleccionadas pelo glifosato. Em contrapartida, 63, 80 e 88% das cepas isoladas dos solos A1, A2 e A3, respectivamente, apresentaram suscetibilidade ao ertapenem (Gráfico 3). Apesar de não ter havido um número expressivo de resistência ao ertapenem, o fato destas cepas existirem no ambiente e possivelmente cosseleccionadas pelo glifosato é preocupante. Antibióticos carbapenêmicos são, geralmente, aplicados no tratamento clínico contra bactérias multirresistentes e ainda não são muitos os relatos destas em amostras fora de ambientes hospitalares (ANVISA, 2017). A resistência a esta classe de fármacos está ligada à produção de enzimas carbapenemases expressas por genes localizados, em sua maioria, nos elementos móveis do DNA, especialmente em plasmídeos, o que favorece sua disseminação (NORDMANN *et. al.*, 2012).

Gráfico 2. Perfil de resistência a antibióticos das cepas isoladas



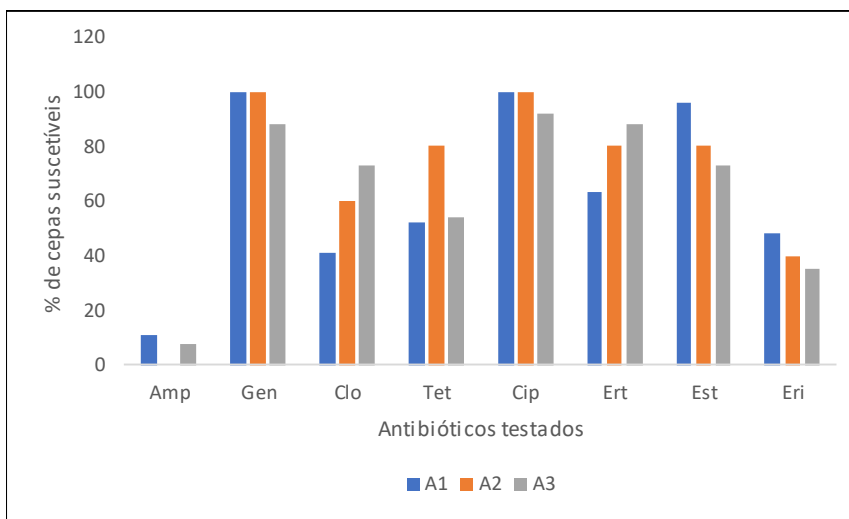
A1 = solo agroflorestal; A2 = solo sem manejo; A3 = solo de manejo convencional; Amp = ampicilina; Gen = gentamicina; Clo = cloranfenicol; Tet = tetraciclina; Cip = ciprofloxacina; Ert = ertapenem; Est = estreptomicina; Eri = eritromicina.

Fonte: elaborado pelo autor

Importante notar que as cepas isoladas de A1 e A2 apresentaram suscetibilidade expressiva aos aminoglicosídeos EST e GEN e à ciprofloxacina (Gráfico 3) o que, segundo

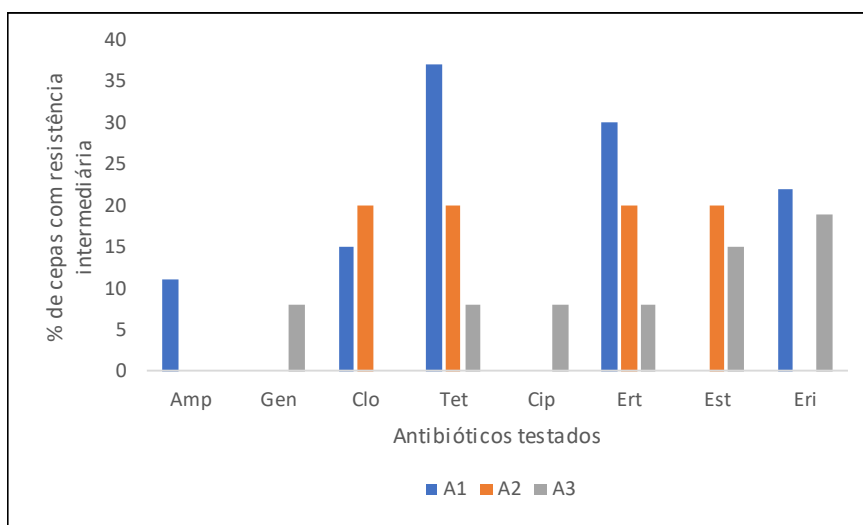
Zimmerman (2010), pode ser efeito das restrições impostas ao uso desses antibióticos. As cepas do solo A3 apresentaram resistência intermediária a estas mesmas classes (Gráfico 4).

Gráfico 3. Perfil de suscetibilidade a antibióticos das cepas isoladas



A1 = solo agroflorestal; A2 = solo sem manejo; A3 = solo de manejo convencional; Amp = ampicilina; Gen = gentamicina; Clo = cloranfenicol; Tet = tetraciclina; Cip = ciprofloxacina; Ert = ertapenem; Est = estreptomicina; Eri = eritromicina.

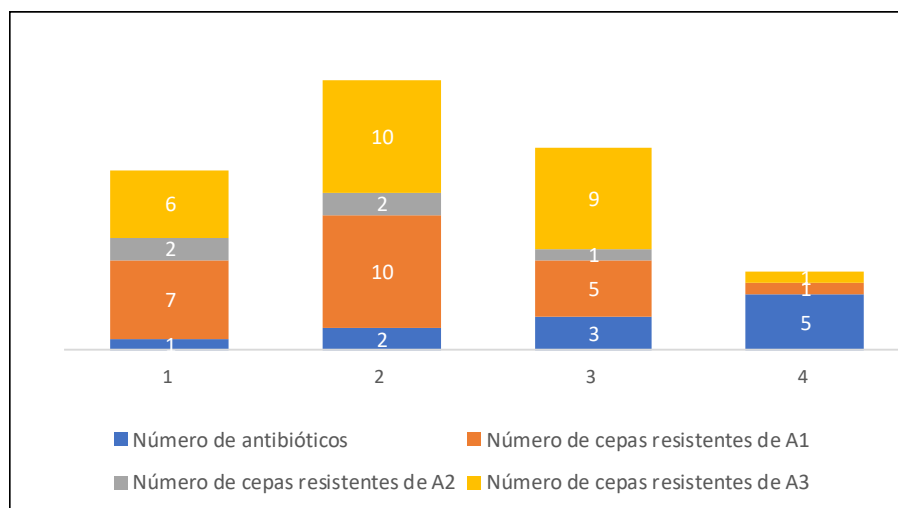
Gráfico 4. Perfil de resistência intermediária a antibióticos das cepas isoladas



A1 = solo agroflorestal; A2 = solo sem manejo; A3 = solo de manejo convencional; Amp = ampicilina; Gen = gentamicina; Clo = cloranfenicol; Tet = tetraciclina; Cip = ciprofloxacina; Ert = ertapenem; Est = estreptomicina; Eri = eritromicina.

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos revelou a presença de cepas multirresistentes em todos os solos estudados (Gráfico 5), conforme a definição proposta por Magiorakos e colaboradores (2012).

Gráfico 5. Perfil de multirresistência a antibióticos das cepas isoladas



Fonte: elaborado pelo autor

O índice de multirresistência a antibióticos (MAR) mostrou que das 17 cepas MDR encontradas, 15 apresentaram resistência a três antibióticos (MAR = 37,5%; Tabela 14) e duas foram resistentes a 5 antibióticos (MAR = 62,5%). Tanto o solo agroflorestal como o sem manejo apresentaram bactérias que foram, na sua maioria, resistentes à AMP, CLO e ERI simultaneamente, enquanto que as bactérias do solo A3 apresentaram resistência à AMP, CLO, ERI e TET. É conhecido que penicilinas, tetraciclina e eritromicina são adicionadas na ração de animais em doses subterapêuticas baixas como promotores de crescimento e que o Brasil figura entre os 5 países que mais se utilizam desta prática no mundo (CASTANAM, 2007; RONQUILLO E HERNANDEZ, 2017). A resistência cruzada antibióticos-glifosato constatada confirma o uso destas substâncias na alimentação dos animais cujos esterco serviram de adubo para os solos estudados, além de corroborar o fato de que doses subletais de antibióticos promovem o surgimento de bactérias resistentes não só às drogas utilizadas como também a outros xenobióticos, no caso o glifosato.

Tabela 14. Índice de multirresistência a antibióticos (MAR) das cepas isoladas dos diferentes tipos de solos estudados

Solo agroflorestral		
Cepa	Antibióticos	MAR (%)
P10	Amp, Clo, Eri	37,5
P22	Amp, Clo, Eri	37,5
P26	Amp, Clo, Eri	37,5
P27	Amp, Clo, Ert, Est, Eri	62,5
P29	Amp, Ert, Eri	37,5
P30	Amp, Clo, Eri	37,5
Solo não manejado		
Cepa	Antibióticos	MAR (%)
S4	Amp, Clo, Eri	37,5
Solo de manejo convencional		
Cepa	Antibióticos	MAR (%)
C8	Amp, Gen, Tet, Ert, Est	62,5
C10	Amp, Tet, Eri	37,5
C11	Amp, Clo, Tet	37,5
C15	Amp, Clo, Est	37,5
C17	Amp, Clo, Tet	37,5
C18	Amp, Est, Eri	37,5
C24	Amp, Clo, Tet	37,5
C25	Amp, Clo, Tet	37,5
C26	Amp, Clo, Eri	37,5
C27	Amp, Clo, Tet	37,5

Amp = ampicilina; Gen = gentamicina; Clo = cloranfenicol; Tet = tetraciclina; Cip = ciprofloxacina; Ert = ertapenem; Est = estreptomicina; Eri = eritromicina. Fonte: elaborado pelo autor

Apesar dos resultados indicarem que o glifosato atuou na cosseleção de bactérias resistentes, deve-se levar em consideração que as soluções comerciais do agrotóxico contêm não só o glifosato em sua forma pura, mas vários outros ingredientes. Logo, alguns destes ingredientes poderiam estar influenciando nos resultados obtidos. Para testar esta hipótese, Kurenbach e colaboradores (2017) compararam os efeitos dos agrotóxicos dicamba, 2,4-D e glifosato em suas formas puras, com as alterações causadas pelos co-compostos das formulações também em suas formas puras e os efeitos causados pelas formulações comerciais. Eles observaram que a atividade de alguns excipientes como o Tween 20 e a carboximetil celulose, assim como os agrotóxicos puros, depende do tipo de antibiótico e da bactéria testada. Os agrotóxicos puros, excipientes e formulações comerciais apresentaram solubilidades diferenciadas e, por este motivo, foram testados em concentrações diferentes. No entanto, em todos os casos, as respostas causadas pelas formulações comerciais e os correspondentes ingredientes ativos caminharam na mesma direção, variando apenas na magnitude dos efeitos. As respostas causadas pelos co-ingredientes, embora geralmente mais fracas que as dos ingredientes ativos, sugeriram que os efeitos podem ser modulados por co-formulantes presentes nas formulações comerciais.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com base nos ensaios laboratoriais realizados, conclui-se que:

- Os solos agroflorestal, de manejo tradicional e solo sem manejo apresentaram bactérias com resistência cruzada glifosato-antibiótico;
- A resistência à ampicilina foi a maior dentre os antibióticos testados, seguida de cloranfenicol, eritromicina e tetraciclina, confirmando o uso destes antibióticos como promotores de crescimento na criação dos animais cujos esterco foram empregados nos cultivos;
- Os solos agroflorestal e de manejo convencional apresentaram praticamente o mesmo número de cepas viáveis resistentes ao glifosato;
- Foram detectadas cepas multirresistentes em todas as amostras de solo estando elas em maior quantidade no solo de manejo convencional;

- Todos os solos foram classificados como arenosos, fato que contribui para a maior lixiviação do glifosato e contaminação dos lençóis freáticos;
- A irrigação com água de poço subterrâneo e a adubação com esterco animal podem ter sido as causas do grande número de bactérias resistentes isoladas do solo agroflorestral.

Seria interessante a quantificação do glifosato nos solos estudados para comprovação de sua influência no surgimento das bactérias MDR bem como uma análise estatística dos resultados para que sejam conhecidos seus graus de significância, possibilitando melhor interpretação dos dados obtidos. Além disto, as cepas viáveis foram enviadas à Universidade Federal de São Carlos para identificação por espectrometria de massas (MALDI-TOF).

Estudos específicos de monitoramento da resistência a antibióticos fazem-se imprescindíveis em trabalhos futuros visto que, recentemente, a ANVISA publicou um plano de ação da vigilância sanitária para este assunto, seguindo recomendações da OMS lançadas em 2015. **“Estima-se que no ano de 2050, caso não sejam tomadas ações efetivas para controlar os avanços da resistência aos antimicrobianos, uma pessoa morrerá a cada três segundos em consequência desse agravo, o que representará 10 milhões de óbitos por ano”** (ANVISA, 2017).

Outros campos a serem explorados seriam: a avaliação da resistência cruzada em função de outros agentes de co-seleção; a predominância de organismos resistentes em ambientes diversos; a relação do uso de antimicrobianos na criação intensiva de animais com o desenvolvimento de patógenos multirresistentes relevantes à saúde humana; a investigação dos mecanismos de resistência e a forma de disseminação destes entre as cepas isoladas no presente trabalho.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A resistência cruzada agrotóxico-antibióticos não se restringe somente ao Eusébio no Ceará. Diariamente são usadas toneladas de agrotóxicos não somente na agricultura de todo o mundo, mas também nos jardins e praças das nossas cidades e até mesmo de nossas residências. O presente trabalho provou que o despejo desse coquetel de substâncias no

ambiente está contribuindo para o desenvolvimento de bactérias multirresistentes em locais inesperados.

Segundo Kurenbach (2018), a disseminação global da resistência aos antibióticos é considerada como a mudança climática da medicina. Os impactos já estão sendo sentidos nos hospitais, onde infecções bacterianas tornam-se cada vez mais difíceis de serem tratadas. O milagre dos antibióticos parece estar chegando ao fim, situação que nos força a refletir sobre como agir para mitigar essa problemática. Isso vai desde o uso mais racional dos antibióticos até o repensar dos manejos agrícolas e formas de criação animal predominante atualmente. Uma agricultura com uso responsável dos agrotóxicos buscando em um futuro próximo a não utilização desses biocidas, bem como políticas públicas que atuem para incentivar a agricultura sustentável já serviriam como um bom começo nessa nova jornada da humanidade em um planeta cada vez mais repleto de dificuldades, muitas delas causadas por nós mesmos.

8 REFERÊNCIAS

ABRASCO, Associação Brasileira de Saúde Coletiva. **Dossiê ABRASCO: Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos.** São Paulo: Expressão Popular, 2015 e 2018. Disponível em https://www.abrasco.org.br/dossieagrotoxicos/wp-content/uploads/2013/10/DossieAbrasco_2015_web.pdf e https://www.abrasco.org.br/site/wpcontent/uploads/2018/08/DOSSIE_NOVO_26_JULHO_Final.pdf. Acesso em: 05 nov. 2018.

ANDREWS, J. M. **BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 8).** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 64, p. 454–489, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19587067>. Acesso em: 14 dez. 2018.

ANVISA, 2016. **PROGRAMA DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS – PARA: RELATÓRIO DAS ANÁLISES DE AMOSTRAS MONITORADAS NO PERÍODO DE 2013 A 2015.** Brasília, 2016. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-de-agrotoxicos-para>. Acesso em: 22 set. 2018.

ANVISA, 2017. **Plano de Ação da Vigilância Sanitária em Resistência a**

Antimicrobianos. Brasília, 2017. Disponível em: <http://www.ismp-brasil.org/site/wp-content/uploads/2018/01/Plano-de-a----o-nacional-em-AMR.pdf> .

BAPTISTA, Maria Galvão de Figueiredo Mendes. **Mecanismos de Resistência aos Antibióticos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, 2013. Disponível em: <http://recil.grupolusofona.pt/bitstream/handle/10437/3264/Mecanismos%20de%20Resist%C3%Aancia%20aos%20Antibi%C3%B3ticos%20%20Maria%20Galv%C3%A3o%20Ba.pdf?sequence=1> . Acesso em 24 set. 2018.

BARROS, Yara Jurema; MELO, Vander de Freitas; DIONÍSIO, Jair Alves; OLIVEIRA, Edilson Batista de; CARON, Leandro; KUMMER, Larissa; AZEVEDO, Júlio César Rodrigues de; SOUZA, Luiz Cláudio de Paula. **INDICADORES DE QUALIDADE DE SOLOS EM ÁREA DE MINERAÇÃO E METALURGIA DE CHUMBO: I-MICRORGANISMOS.** R. Bras. Ci. Solo, v. 34, p. 1397-1411, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbcs/v34n4/36.pdf> . Acesso em: 24 set. 2018.

BASTOS, Rafael Wesley; CARNEIRO, Hellem Cristina Silva; OLIVEIRA, Lorena Vivien Neves de; ROCHA, Karen Maia; FREITAS, Gustavo José Cota; COSTA, Marliete Carvalho; MAGALHÃES, Thaís Furtado Ferreira; CARVALHO, Vanessa Silva Dutra de; ROCHA, Cláudia Emanuela; FERREIRA, Gabriella Freitas. PAIXÃO, Tatiane Alves de; MOYRAND, Frédérique; JANBON, Guilhem; SANTOS, Daniel Assis. **Environmental triazole induces cross-resistance to clinical drugs and affects morphophysiology and virulence of *Cryptococcus gattii* and *C. neoformans*.** Antimicrob Agents Chemother., v. 62. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29109169> . Acesso em: 05 set. 2018.

BAUAINAIN, Antônio Márcio; ALVES, Eliseu; SILVEIRA, José Maria; NAVARRO, Zander. **O mundo rural no Brasil do século 21: A formação de um novo padrão agrário e agrícola.** Brasília: Embrapa/Instituto de Economia da Unicamp, 2014. p. 373-422. Disponível em: https://www3.eco.unicamp.br/nea/images/arquivos/O_MUNDO_RURAL_2014.pdf . Acesso em: 04 set. 2018.

BAUER, A. W.; KIRBY, M. M.; SHERRIN, J. D. **Antibiotics susceptibility testing by standardized single disk method.** American Journal of Pathology. Amsterdam,

v.45, p.493-496, 1966. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5325707> . Acesso em: 31 out. 2018.

BERGSTROM, Lars; BORJERSSON, Elisabet; STENSTROM, John. **Laboratory and Lysimeter Studies of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid in a Sand and a Clay Soil**. Journal of Environmental Quality Abstract - Organic Compounds in the Environment, v. 40, n. 1, p. 98-108, 2011. Disponível em: <https://dl.sciencesocieties.org/publications/jeq/abstracts/40/1/98> . Acesso em: 22 set. 2018.

BEZERRA, W. G. A.; HORN, R. H.; SILVA, I. N. G.; TEIXEIRA, R. S. C.; LOPES, E. S.; ALBUQUERQUE, Á. H.; CARDOSO, W. C. **Antibióticos no setor avícola: uma revisão sobre a resistência microbiana**. Arch. Zootec. v. 66, n. 254, p. 301-307, 2017. Disponível em: <http://www.uco.es/ucopress/az/index.php/az/article/view/2335> . Acesso em: 19 nov. 2018.

BLANCO, Paula; HERNANDO-AMADO, Sara; REALES-CALDERON, Jose Antonio; CORONA, Fernando; LIRA, Felipe; ALCADE-RICO, Manuel; BERNARDINI, Alejandra; SANCHEZ, Maria Blanca; MARTINEZ, Jose Luis. **Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants**. Microorganisms, v. 4, n. 14, p. 1-19, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5029519/> . Acesso em: 23 nov. 2018.

BONZI, Ramón Stock. **Meio século de primavera silenciosa: um livro que mudou o mundo**. Desenvolvimento e Meio Ambiente, n. 28, p. 207-215, 2013. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/made/article/download/31007/21665> . Acesso em: 07 set. 2018.

BRASIL, 2002. Decreto Nº 4.074, de 4 de Janeiro de 2002. Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Brasília: **DOU Diário Oficial da União**, 2002. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/D4074.htm#art98 . Acesso em: 07 set. 2018.

BRITO, Monique Araújo de; CORDEIRO, Benedito Carlos. **Necessidade de novos antibióticos**. Bras. Patol. Med. Lab. v. 48, n. 4, p. 247-249, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/jbpmL/v48n4/v48n4a02.pdf> . Acesso em: 23 set. 2018.

BUENO, Paulo Agenor Alves; OLIVEIRA, Vitória Maria Teodoro de; GUALDI, Bruna Lopes; SILVEIRA, Pedro Henrique Nascimento; PEREIRA, Rafael Gon; FREITAS, Caio Evandro Santos de; BUENO, Raquel de Oliveira; SEKINE, Elizabete Satsuki; SCHWACZ, Kaiser Dias. **Indicadores microbiológicos de qualidade do solo em recuperação de um sistema agroflorestal**. Acta Brasiliensis, v. 2, n. 2, p. 40-44, 2018. Disponível em: revistas.ufcg.edu.br/ActaBra/index.php/actabra/article/download/96/37/. Acesso em: 24 set. 2018.

CASTANON, J. I. R. History of the Use of Antibiotic as Growth Promoters in European Poultry Feeds. Poultry Science, v. 86, p. 2466–2471, 2007. Disponível em: https://watermark.silverchair.com/poultrysci86-2466.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kKhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAs_wggJHBgkqhkiG9w0BBwagggI4MIICNAIBADCCAi0GCSqGSIb3DQEHATAeBgIghkgBZQMEAS4wEQQMCZPJqEX80OCWaBi8AgEQgIIB_kVMofffLgYivCv1fmRatOnYqumbTmUokPJXczQWvIFEJv4kM4-0AHOj3ft4BMw1B-6_o7BVXUsG-sMxuRsx_J27zcMwXYsqIuorJoTnArMFz-3-zvMockjkt3V-C0Ffdf_IYXb_83gNUCAO8zwt4p7RP4tqPjwZAQ4OdCnLc7AX3557ImcIPR7P1zWbd03c4Lj8py_CJd9rf2uLd44h865_y5bXQI7J9DnEmLTHq58FBFwErpX0f-11Vg3ILmguTnLDosXHAh6-waMFFgWVKdosapEPEj1ZJ144_1KM-qSE5rUKwFK74DFIRxerJapfx4F-wFGETpvPvD8dkvb_D0UGOgNgoZO2buyoVHwvO-2IBObf0Fsm4Gig6zzHocRAoEeNkdf2exyE5i_Kuq2XTI-Y13H0VIB49x_Lef06fLVEgEJHrYbPXnX1fNknGcjmclOvZp5rJ35vakaxIbO5twE13peiDN9P1_X7f2P6-HAKiUIkHyspTqe22tBzYHnzSg88eSdCUc34cSm5I7FFr66b0_Nh7r4FKrC8CnZRRixi16IP5qAZT0icd9ssdFNeYFLLp9xZJxNj6slAJAvJ526YFBk1Y0eSKJaHxq6rbOqlalm0BgX-3nuWZvy8g5tVI_WKOV_mgZGjzvwD9PkzSc_Lel85Y0S62JaW8-oLw. Acesso em 20 dez. 2018.

CHEN, Chunfeng; LIU, Wenjie; JIANG, Xiaojin. WU, Junen. **Effects of rubber-based agroforestry systems on soil aggregation and associated soil organic carbon: Implications for land use**. Geoderma, v. 299, p. 13–24, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016706117300769>. Acesso em: 26 set. 2018.

CLSI, 2016. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. M100S, ed. 26, Wayne, PA, USA, 2016.

COSTA, Vanessa Indio do Brasil da; MELLO, Márcia Sarpa de Campos de; FRIEDRICH, Karen. **Exposição ambiental e ocupacional a agrotóxicos e o linfoma não**

Hodgkin. SAÚDE DEBATE, v. 41, n. 112, p. 49-62, 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/sdeb/v41n112/0103-1104-sdeb-41-112-0049.pdf> . Acesso em: 10 set. 2018.

CUNHA, Fernanda Viana da; BATISTA, Selma Baia. **Análise fenotípica e genotípica de bactérias heterotróficas e fixadoras de nitrogênio em sedimento na bacia do Rio Cuiabá-MT.** Rev. Ambient. Água v. 9 n. 1, p. 68-82, 2014. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1980-993X2014000100008 . Acesso em: 02 dez. 2018.

DAVIES, Julian; DAVIES, Dorothy. **Origins and Evolution of Antibiotic Resistance.** Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 74, n. 1, p. 417-433, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2937522/> . Acesso em: 23 set. 2018.

DEFARGE, N; VENDÔMOIS, J. Spiroux; SÉRALINI, G. E. **Toxicity of formulants and heavy metals in glyphosate-based herbicides and other pesticides.** Toxicology Reports, v. 8, p. 156-163, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221475001730149X> . Acesso em: 9 set. 2018.

EDWARDS, Clive A. **Environmental Pollution by Pesticides:** Chapter 11- Pesticide Residues in Soil and Water. 1. ed. Londres: Plenum Publishing Company Ltd, 1973.

EMBRAPA, 2006. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos.** 2. ed. Brasília, 2006. 4-5 p. Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/126047/mod_resource/content/1/Sistema%20Brasileiro%20de%20Classifica%C3%A7%C3%A3o%20de%20Solos%20%C2%AA%20edi%C3%A7%C3%A3o.pdf . Acesso em: 24 set. 2018.

EXNER, Martin; BHATTACHARYA, Sanjay; CHRISTIANSEN, Barbel; GEBEL, Jurgen; GORONCY-BERMES, Peter; HARTEMANN, Philippe; HEEG, Peter; ILSCHNER, Carola; KRAMER, Alex; LARSON, Elaine; MARKENS, Wolfgang; MIELKE, Martin; OLTMANN, Peter; ROSS, Brigit; ROTTER, Manfred; SCHMITHAUSEN, Ricarda Maria; SONNTAG, Hans-Gunther; TRAUTMANN, Matthias. **Antibiotic resistance:** What is so special about multidrug-resistant Gram-negative bacteria? *GMS Hygiene and Infection Control*, v. 12, p. 1-24, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5388835/> . Acesso em: 5 nov. 2018.

FOLK, Robert Louis, WARD, William C. **Brazos River bar [Texas]; a study in the significance of grain size parameters.** Journal of Sedimentary Research, v. 25, n. 1, p. 3-26, 1957. Disponível em: <https://pubs.geoscienceworld.org/sepm/jsedres/article/27/1/3/95232/brazos-river-bar-texas-a-study-in-the-significance> . Acesso em: 19 nov. 2018.

FRIZZOLA, Heloisa Ferreira; GOMES, Marco Antônio Ferreira; SOUZA, Manoel Dornelas de. **Manual de Procedimentos de Coleta de Amostras em Áreas Agrícolas para Análise da Qualidade Ambiental: Solo, Água e Sedimentos.** Embrapa Meio Ambiente Jaguariúna, 2006. 25-32 p.

GALLI, Antônio J. B.; MONTEZUMA, Marcelo C. **Glifosato: Alguns Aspectos da Utilização do Herbicida Glifosato na Agricultura.** 1. ed. Santo André: ACADCOM Gráfica e Editora Ltda, 2005. 12-13 p. Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Plantas_daninhas_glifosatoID-VCQ0aRyNYE.pdf . Acesso em: 10 set. 2018.

GARRITY, George M.; BRENNER, Don J.; KRIEG, Noel R.; STALEY, James T. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** 2. ed. v. 2, Nova York, Springer-Verlag, 2002. 587-850 p.

HUPFFER, Haide Maria; POL, Jeferson Jeldoci. **O Direito de Escolha do Consumidor e a Necessária Informação Sobre Alimentos com Agrotóxicos.** Revista do Programa de Pós-Graduação em Direito da UFC, v. 32, p. 41-67, 2017. Disponível em: http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/30501/1/2017_art_hmhupffer.pdf . Acesso em: 05 set. 2018.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis. **Boletins anuais de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil:** Boletim 2017. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos> . Acesso em: 05 set. 2018.

KOHANSKI, Michael A.; DePRISTO, Mark A.; COLLINS, James. **Sublethal Antibiotic Treatment Leads to Multidrug Resistance via Radical-Induced Mutagenesis.** Molecular Cell, v. 37, n. 3, p. 311-320, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276510000286> . Acesso em: 23 set. 2018.

KORB, Arnildo. **Resistência aos antimicrobianos de Escherichia coli isoladas**

de frangos da região metropolitana de Curitiba e identificação de riscos à saúde humana. Tese (Doutorado em Meio Ambiente e Desenvolvimento) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/35813/R%20-%20T%20-%20ARNILDO%20KORB.pdf?sequence=2&isAllowed=y> . Acesso em 22 nov. 2018.

KURENBACH, Brigitta; GIBSON, Paddy S.; COLINA, Amy M.; BITZER, Adam S.; SILBY, Mark W.; GODSOE, William; HEINEMANN, Jack A. **Herbicide ingredients change *Salmonella enterica* sv. Typhimurium and *Escherichia coli* antibiotic responses.** *Microbiology*, v. 163, n. 12, p. 1791–1801, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5845734/> . Acesso em: 24 nov. 2018.

KURENBACH, Brigitta; HILL, Amy M.; GODSOE, William; HAMELSVELD, Sophie van; HEINEMANN, Jack A. **Agrichemicals and antibiotics in combination increase antibiotic resistance evolution.** *PeerJ*, 2018. Disponível em: <https://peerj.com/articles/5801.pdf> . Acesso em: 19 nov. 2018.

KURENBACH, Brigitta; MARJOSHI, Delphine; AMÁBILE-CUEVAS, Carlos F.; FERGUSON, Gayle C.; GODSOE, William; GIBSON, Paddy; HEINEMANN, Jack A. **Sublethal Exposure to Commercial Formulations of the Herbicides Dicamba, 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid, and Glyphosate Cause Changes in Antibiotic Susceptibility in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.** *MBio*, v. 6, n. 2, p. e00009-15, 2015. Disponível em: <https://mbio.asm.org/content/6/2/e00009-15.short> . Acesso em: 05 set. 2018.

LEVY, Carlos Emílio. **Procedimentos laboratoriais: da requisição do exame à análise microbiológica.** In: Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde. Editora Agencia de Vigilância Sanitária (ANVISA), módulo 3, 45 p., 2004. Disponível em: http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/manual_microbiologia_completo.pdf . Acesso em: 31 out. 2018.

LI, Xian-Zhi; PLÉSIAT, Patrick; NAKAIDO, Hiroshi. **The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria.** *Clinical Microbiology Reviews*, v. 28, n. 2, p. 337-418, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4402952/> . Acesso em: 23 nov. 2018.

LIMA, Inácio Pereira. **Avaliação da Contaminação do Leite Materno pelo**

Agrotóxico Glifosato em Puérperas Atendidas em Maternidades Públicas no Piauí. Dissertação (Mestrado em Saúde da Mulher) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017. Disponível em: http://repositorio.ufpi.br/xmLui/bitstream/handle/123456789/1366/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20Inacio%20Pereira%20Lima_atual.pdf?sequence=1 . Acesso em: 22 set. 2018.

LIU, Ying-Bao; LONG, Ming-XIU; YIN, Ya-Jie; SI, Mei-Ru; ZHANG, Lei; LU, Zhi-Qiang; WANG, Yao; SHEN, Xi-Hui. **Physiological roles of mycothiol in detoxification and tolerance to multiple poisonous chemicals in *Corynebacterium glutamicum*.** Archives of Microbiology, v. 195, n. 6, p. 419–429, 2013. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00203-013-0889-3> . Acesso em: 24 set. 2018.

LORING, Douglas H.; RANTALA, Reijo T. T.; **Manual for the geochemical analyses of marine sediments and suspended particulate matter.** Earth-Science Reviews, v. 34, n. 4, p. 235-283, 1992. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/001282529290001A#!> . Acesso em: 19 nov. 2018.

LOZANO, Veronica L.; DEFARGE, Nicolas; ROCQUE, Louis-Marie; MESNAGE, Robin; HENNEQUIN, Didier; CASSIER, Renaud; VENDÔMOIS, Joel Spiroux de; PANOFF, Jean-Michel; SÉRALINI, Gilles-Eric; AMIEL, Caroline. **Sex-dependent impact of Roundup on the rat gut microbiome.** Toxicology Reports, v. 5, p. 96-107, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214750017301129> . Acesso em: 24 nov. 2018.

MACCONKEY, Alfred T. **Bile Salt Media and their advantages in some Bacteriological Examinations.** J Hyg (Lond), v. 8, n. 3, 1908. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2167122/> . Acesso em: 21 nov. 2018.

MACCONKEY, Alfred T. **Lactose-Fermenting Bacteria in Faeces.** J Hyg (Lond), v. 5, n. 3, 1905. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2236133/> . Acesso em: 21 nov. 2018.

MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J. F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D. L.; RICE, L. B.; STELLING, J.; STRUELENS, M. J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J. T.; MONNET, D. L. **Multidrug - resistant, extensively drug - resistant and pandrug - resistant bacteria: an international expert proposal for**

interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14616323> . Acesso em: 29 set. 2018.

MARQUES, Sebastião Rovilson. **Sistemas de manejo agrícola, qualidade do solo e o controle da erosão em parcelas experimentais**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006. Disponível em: http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/257049/1/Marques_SebastiaoRovilson_M.pdf . Acesso em: 25 set. 2018.

MAZZOLENI, Eduardo Mello; NOGUEIRA, Jorge Madeira. **Agricultura orgânica**: características básicas do seu produtor. *RER*, Rio de Janeiro, vol. 44, nº 02, p. 263-293, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/resr/v44n2/a06v44n2.pdf> . Acesso em: 05 set. 2018.

McCOMB, Brenda C.; CURTIS, Larry; CHAMBERS, Carol L.; NEWTON, Michael; BENTSON, Kenneth. **Acute toxic hazard evaluations of glyphosate herbicide on terrestrial vertebrates of the oregon coast range**. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 15, p. 266–272, 2008. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1065%2Fespr2007.07.437> . Acesso em: 22 set. 2018.

MELO, Itamar Soares de; AZEVEDO, João Lúcio de. **Microbiologia Ambiental**. 2. ed. Jaguaruana: Embrapa Meio Ambiente. 2008. 18-48 p. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/15285/microbiologia-ambiental> . Acesso em: 07 set. 2018.

MOREIRA, Fátima M. S.; SIQUEIRA, José Oswaldo. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed, Lavras: Editora UFLA, 2006. 1-82 p. Disponível em: http://www.esalq.usp.br/departamentos/lso/arquivos_aula/LSO_400%20Livro%20-%20Microbiologia%20e%20bioquimica%20do%20solo.pdf . Acesso em: 24 set. 2018.

MORGERA, Elisa; CARO, Carmem Bullón; DURÁN, Gracia Marín. **Organic agriculture and the Law**: environmental and social benefits of organic agriculture. *FAO Legislative Studies*, Rome, v.107, p.6-10, 2012. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/016/i2718e/i2718e.pdf>>. Acesso em: 26 set. 2018.

NASCIMENTO, Viviane Felix Silva; ARAÚJO, Magnólia Fernandes Florêncio.

Ocorrência de Bactérias Patogênicas Oportunistas em Reservatório do Semiárido do Rio Grande do Norte, Brasil. Revista de Ciências Ambientais, v. 7, n. 1, p. 91-104, 2013.

Disponível em: <https://revistas.unilasalle.edu.br/index.php/Rbca/article/viewFile/1080/884> .

Acesso em: 18 dez. 2108.

NATURE, 2017. Counter Resistance. **Nature Microbiology**, 25 abril 2017.

Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nmicrobiol201771> . Acesso em: 05 set. 2018.

NORDMANN, P.; DORTET, G.; POIREL, L. **Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm!** Trends Mol Med., v. 18, n. 5, p. 263-272, 2012.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22480775> . Acesso em 24 nov. 2018.

OMS, 2005. **Glyphosate and AMPA in Drinking-water.** Genebra, 2005.

Disponível em:

http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/glyphosateampa290605.pdf .

Acesso em: 22 set. 2018.

OMS, 2009. **The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification.** Genebra, 2009. Disponível em:

http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_2009.pdf?ua=1 . Acesso em: 22 set.

2018.

OMS, 2017. **List of bacteria for which new antibiotics are urgently needed.**

Disponível em: <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> . Acesso em: 13/12/2018.

<https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> . Acesso em: 13/12/2018.

ORZECH, Kathryn M.; NICHTER, Mark. **From Resilience to Resistance:**

Political Ecological Lessons from Antibiotic and Pesticide Resistance. *Annu. Rev. Anthropol.*,

v. 37, p. 267–282, 2008. Disponível em:

<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.anthro.37.081407.085205> . Acesso

em: 22 set. 2018.

OSTEN, Jaime Rendón-von; DZUL-CAAMAL, Ricardo. **Glyphosate Residues in Groundwater, Drinking Water and Urine of Subsistence Farmers from Intensive Agriculture Localities: A Survey in Hopelchén, Campeche, Mexico.** *Int J Environ Res Public Health*,

v. 14, n. 6, p. 595. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5486281/> . Acesso em: 19 nov. 2018.

PERES, Frederico; MOREIRA, Josino Costa; DUBOIS, Gaetan Serge.

Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. 2003. 21-41 p. Disponível em: <http://books.scielo.org/id/sg3mt/pdf/peres-9788575413173-03.pdf> . Acesso em: 07 set. 2018.

PÉREZ, Daniel Vidal; BREFIN, Maria de Lourdes Mendonça; POLIDORO, José Carlos. **Solo, da origem da vida ao alicerce das civilizações:** uso, manejo e gestão. *Pesq. agropec. bras.* v. 51, n. 9, 2016. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2016000900001 . Acesso em: 24 set. 2018.

PRIMAVESI, Ana Maria. **Agroecologia e manejo do solo.** *Agriculturas*, v. 5, n. 3, p. 7-10, 2008. Disponível em: <http://aspta.org.br/wp-content/uploads/2014/10/Artigo-1-Agroecologia-e-manejo-do-solo.pdf> . Acesso em: 18 dez. 2018.

RANGASAMY, Kirubakaran; ATHIAPPAN, Murugan; DEVARAJAN, Natarajan; PARRAY, Javid. **Emergence of multi drug resistance among soil bacteria exposing to insecticides.** *Microbial Pathogenesis.*, v. 105, p. 153-165. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401017300918> . Acesso em: 04 set. 2018.

RANGASAMY, Kirubakaran; ATHIAPPAN, Murugan; DEVARAJAN, Natarajan; SAMYKANNU, Gopinath; PARRAY, Javid; ARULJOTHI, K. N.; SHAMEEN, Nowsheen; ALQARAWI, Abdulaziz A.; HASHEM, Abeer; ALLAH, Elsayed Fathi Abd. **Pesticide degrading natural multidrug resistance bacterial flora.** *Microbial Pathogenesis*, v. 115, p. 304-310, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401017307581> . Acesso em: 23 set. 2018.

RONQUILLO, Manuel Gonzalez; HERNANDEZ, Juan Carlos Angeles. **Antibiotic and synthetic growth promoters in animal diets: Review of impact and analytical methods.** *Food Control*, v. 72, p. 255-267, 2017. Disponível em <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0956713516301062?token=5E2A4951DDA2FF609F125E58B48282008CD8F5655EA1CE3B8BA81BB2806BF81CEDA6208351D409BCB4CD4110E335D350> . Acesso em em 20 dez. 2018.

ROSSETI, Jean Sérgio; COELHO, Gustavo Ferreira; GRECO, Marcelo; STREY, Leonardo; JUNIOR, Affonso Celso Gonçalves. **Agricultura convencional versus sistemas agroecológicos:** modelos, impactos, avaliação da qualidade e perspectivas. *Scientia Agraria*

Paranaensis - SAP., v.13, n.2, p.80-94, 2014. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/279230362_Agricultura_Convencional_versus_Sistemas_Agroecologicos_Modelos_Impactos_Avaliacao_da_Qualidade_e_Perspectivas . Acesso em: 25 set. 2018.

SANCHÍS, Josep; KANTIANI, Lina; LLORCA, Marta; RUBIO, Fernando; GINEBREDA, Antoni; FRAILE, Josep; GARRIDO, Teresa; FARRÉ, Marinella. **Determination of glyphosate in groundwater samples using an ultrasensitive immunoassay and confirmation by on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry.** Analytical and Bioanalytical Chemistry, v. 402, n. 7, p. 2335–2345, 2012. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00216-011-5541-y> . Acesso em: 20 nov. 2018.

SANDERS, Erin R. **Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods.** Journal of Visualized Experiments, v. 63, p. 1-18, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4846335/> . Acesso em: 15 dez. 2018.

SHEHATA, Awad A.; SHRODL, Wieland; ALDIN, Alaa A.; HAFEZ, Hafez M.; KRUGER, Monika. **The Effect of Glyphosate on Potential Pathogens and Beneficial Members of Poultry Microbiota In Vitro.** Curr Microbiol, v. 66, p. 350-358, 2013. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00284-012-0277-2> . Acesso em: 24 nov. 2018.

SHIN, Keumchul; ASCUNCE, Marina S.; NAROUEI-KHANDAN, Hossein A.; SUN, Xiaolan; JONES, Debra; KOLAWOLE, Oluwaseun Olawale; GOSS, Erica M.; BRUGGEN, Ariena H. C. van. **Effects and side effects of penicillin injection in huanglongbing affected grapefruit trees.** Crop Protection, v. 90, p. 106-116, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219416302320> . Acesso em: 24 set. 2018.

SILVA, Paulo da; NAHAS, Ely. **Bacterial diversity in soil in response to different plans, phosphate fertilizers and liming.** Braz. J. Microbiol, v.33, n. 4, 2002. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822002000400005 . Acesso em: 25 set. 2018.

SILVEIRA, Adriana Parada Dias da; FREITAS, Sueli dos Santos. **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental.** Campinas: Instituto Agrônômico, 2007. 193-217 p. Disponível em:

<http://www.cisguanabara.unicamp.br/redeagroecologia/arquivos/biblagroecologia/microbiotad osolo.pdf> . Acesso em: 05 set. 2018.

SIMONSEN, Louise; FOMSGAARD, Inge S.; SVENSMARK, Bo; SPLIID, Niels Henrik. **Fate and availability of glyphosate and AMPA in agricultural soil**. Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, v. 45, p. 365-375, 2008. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03601230802062000> . Acesso em: 22 set. 2018.

SMITH, David L.; DUSHOFF, Jonathan; MORRIS, J. Glenn Jr. **Agricultural Antibiotics and Human Health**. PLoS Medicine, v. 2, p. 731-735, 2005. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.0020232> . Acesso em: 24 set. 2018.

SOUZA, Ester Sena; BLEI, Renata Aparecida; CARRILHO, Claudia Maria Dantas de Maio; MATSUO, Tiemi; YAMADA-OGATTA, Sueli Fumie; ANDRADE, Galdino; PERUGINI, Marcia Regina Eches; PIERI, Flávia Meneguetti; DESSUNTI, Elma Mathias; KERBAUY, Gislena. **Mortalidade e Riscos Associados a Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Texto Contexto Enferm., Florianópolis, v. 24, n. 1, p. 220-228, 2015. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/tce/v24n1/pt_0104-0707-tce-24-01-00220.pdf . Acesso em: 05 set. 2018.

STAUB, Jeffrey M.; BRAND, Leslie; TRAN, Minhtien; KONG, Yifei; ROGERS, Stephen G. **Bacterial glyphosate resistance conferred by overexpression of an E. coli membrane efflux transporter**. J Ind Microbiol Biotechnol, v. 39, p. 641-647, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22089966> . Acesso em: 19 nov. 2018.

STINE, O. Colin; JOHNSON, Judith A.; KEEFER-NORRIS, Ananda; PERRY, Kellie L.; TIGNO, Justine. QAIYUMI, Sadaf; STINE, Maryruth S.; MORRIS, J. Glenn Jr. **Widespread distribution of tetracycline resistance genes in a confined animal feeding facility**. International Journal of Antimicrobial Agents, v. 29, n. 3, p. 348-352, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857906004808> . Acesso em: 24 set. 2018.

THONGPRAKAI SANG, Siriporn; THIAN TANAWAT, Apinya; RANGKADILOK, Nuchanart; SURIYO, Tawit; SATAYAVIVAD, Jutamaad. **Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors**. Food and Chemical

Toxicology, v. 59, p. 129-136, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691513003633> . Acesso em: 22 set. 2018.

VAN BRUGGEN, A. H. C.; HE, M. M.; SHIN, K.; MAI, V.; JEONG, K. C.; FINCKH, M. R.; MORRIS, J. G. Jr. **Environmental and health effects of the herbicide glyphosate**. Science of The Total Environment, v. 616–617, p. 255-268, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969717330279> . Acesso em: 20 nov. 2018.

VAN STEMPVOORT, D. R.; ROY, J. W.; BROWN, S. J; BICKERTON, G. **Residues of the herbicide glyphosate in riparian groundwater in urban catchments**. Chemosphere, v. 25, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653513013659> . Acesso em: 20 nov. 2018.

VASCONCELOS, F. R.; REBOUÇAS, R. H.; EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; SOUSA, O. V. de; VIEIRA, R. H. S. F. **Perfil de Resistência Antimicrobiana de Escherichia Coli Isoladas do Açude Santo Anástacio, Ceará, Brasil**. Arq. Inst. Biol., v.77, n.3, p.405-410, 2010.

VAZQUEZ, Medardo Avila; MATURANO, Eduardo; ETCHEGOYEN, Agustina; DIFILIPPO, Flavia Silvina; MACLEAN, Bryan. **Asociación entre cáncer y exposición ambiental a glifosato**. International Journal of Clinical Medicine, v. 8, n. 2, p. 73-85, 2017. Disponível em: <http://reduas.com.ar/wp-content/uploads/downloads/2017/02/txt-ca-y-glifo-esp%C3%B1ol.pdf> . Acesso em: 10 set. 2018.

WANG, Jinchuang; REN, Changqi; CHEN, Hanting; BUGHIO, Mansoor Ahmed; LI, Qinfen. **Conversion of rainforest into agroforestry and monoculture plantation in China: Consequences for soil phosphorus forms and microbial community**. Science of the Total Environment, v. 595, p. 769–778, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28410526> . Acesso em: 26 set. 2018.

WANG, Shizong; SEIWERT, Bettina; KASTNER, Matthias; MILTNER, Anja; SCHAFFER, Andreas; REEMTSMA, Thorsten; YANG, Qi; NOWAK, Karolina M. **(Bio)degradation of glyphosate in water-sediment microcosms – A stable isotope co-labeling approach**. Water Research, v. 99, p. 91-100, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135416302391> . Acesso em: 22 set.

2018.

WEBBER, Mark A.; RICCI, Vito; WHITEHEAD, Rebekah; PATEL, Meha; FOOKES, Maria; IVENS, Alasdair; PIDDOCK, Laura J. V. **Clinically Relevant Mutant DNA Gyrase Alters Supercoiling, Changes the Transcriptome, and Confers Multidrug Resistance.** *mBio*, v. 4, n. 4, p. 1-10, 2015. Disponível em: <https://mbio.asm.org/content/4/4/e00273-13> . Acesso em: 19 nov. 2018.

WEXLER, Philip. **Encyclopedia of Toxicology.** 3. ed. Londres: Elsevier, 2014, 767-769 p. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123864543001482> . Acesso em: 22 set. 2018.

ZHANG, Changpeng; HU, Xiuqing; LUO, Jinyan; WU, Zhiyi; WANG, Li; LI, Bin; WANG, Yanli; SUN, Guochang. **Degradation Dynamics of Glyphosate in Different Types of Citrus Orchard Soils in China.** *Molecules*, v. 20, n. 1, p. 1161-1175, 2015. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1420-3049/20/1/1161> . Acesso em: 22 set. 2018.

ZHANG, Min; LIANG, Yongchao; SONG, Alin; YU, Bing; ZENG, Xibai; CHEN, Ming-Shun; YIN, Huaqun; ZHANG, Xiaoxia; SUN, Baoli; FAN, Fenliang. **Loss of soil microbial diversity may increase insecticide uptake by crop.** *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 240, p. 84-91, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167880917300737> . Acesso em: 26 set. 2018.

ZILLI, Jerri Édson; RUMJANEK, Norma Gouvêa; XAVIER, Gustavo Ribeiro; COUTINHO, Heitor Luiz da Costa; NEVES, Maria Cristina Prata. **Diversidade Microbiana como Indicador de Qualidade do Solo.** *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, Brasília, v. 20, n. 3, p. 391-411, 2003. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/89554/1/v20n301.pdf> . Acesso em: 25 set. 2018.

ZIMERMAN, Ricardo Ariel; **Boletim 03 - Uso Indiscriminado de Antimicrobianos e Resistência Microbiana.** *Uso Racional de Medicamentos: Temas Seleccionados.* Ministério da Saúde, Brasília, 2010. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_docman&view=download&alias=1348-uso-indiscriminado-antimicrobianos-e-resistencia-microbiana-boletim-n-03-8&category_slug=uso-racional-medicamentos-685&Itemid=965 . Acesso em 18 dez. 2018.