

**IDENTIFICAÇÃO E RESISTÊNCIA
ANTIMICROBIANA DE *Aeromonas* MÓVEIS
PROVENIENTES DE PEIXES E AMBIENTES
AQUÁTICOS**

DANIELA HIRSCH

~~SECRET~~

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de
Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Hirsch, Daniela

Identificação e resistência antimicrobiana de *Aeromonas* móveis
provenientes de peixes e ambientes aquáticos / Daniela Hirsch. -- Lavras :
UFLA, 2004.

42 p. : il.

Orientador: Henrique Cesar Pereira Figueiredo.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. *Aeromonas*. 2. Resistência antimicrobiana. 3. Tilápia. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD-639.3758

58473
049943

DANIELA HIRSCH

**IDENTIFICAÇÃO E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *Aeromonas*
MÓVEIS PROVENIENTES DE PEIXES E AMBIENTES AQUÁTICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação “Stricto Sensu” em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Henrique César Pereira Figueiredo

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2004

DANIELA HIRSCH

**IDENTIFICAÇÃO E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE
Aeromonas MÓVEIS PROVENIENTES DE PEIXES E
AMBIENTES AQUÁTICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação "Stricto Sensu" em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de "Mestre".

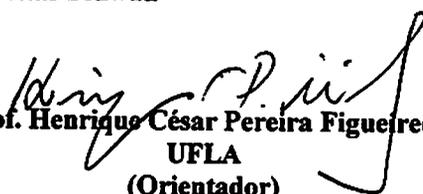
APROVADA em 25 de junho de 2004

Profa. Roberta Hilsdorf Piccoli **UFLA**

Profa. Priscila Vieira Rosa Logato **UFLA**

Profa. Eliana Pinheiro de Carvalho **UFLA**

Profa. Rosane Freitas Schwan **UFLA**


Prof. Henrique César Pereira Figueiredo
UFLA
(Orientador)

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pelo qual foi possível a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Medicina Veterinária, pela concessão do laboratório para a realização do experimento.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Henrique César Pereira Figueiredo, pelas instruções e amizade.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli, pelo fornecimento de reagentes.

À Profa. Dra. Priscila Vieira Rosa Logato, pela indicação das pisciculturas e pelo contato com os proprietários.

Ao Prof. MSc. Geraldo Márcio da Costa, pelo auxílio técnico.

Aos proprietários das pisciculturas, pelo fornecimento dos materiais e informações.

Aos meus colegas de pós-graduação, Delton, Rejeana, Gláucia, Daniela, Cleube, Simone e Larissa, pela amizade e auxílio técnico.

À laboratorista Dircéia, pelo auxílio inestimável na execução do experimento.

Às alunas de graduação Flaviane e Fernanda, pelo auxílio na condução dos testes bioquímicos.

Finalmente, aos animais, sem os quais a execução do experimento não teria sido possível.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	03
2.1 Piscicultura.....	03
2.2 <i>Aeromonas</i> móveis.....	04
2.2.1 Taxonomia.....	04
2.2.2 Infecções associadas.....	05
2.2.3 Ocorrência em alimentos e na água.....	06
2.2.4 Resistência a antibióticos.....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Seleção das pisciculturas.....	15
3.2 Coleta de materiais para o isolamento de <i>Aeromonas</i>	15
3.3 Isolamento das espécies de <i>Aeromonas</i>	16
3.3.1 Isolamento de <i>Aeromonas</i> das amostras de água do tanque e de distribuição.....	16
3.3.2 Isolamento de <i>Aeromonas</i> da superfície das tilápias.....	16
3.3.3 Isolamento de <i>Aeromonas</i> do rim das tilápias.....	16
3.4 Identificação das espécies de <i>Aeromonas</i>	17
3.4.1 Identificação presuntiva.....	17
3.4.2 Identificação bioquímica.....	17
3.5 Perfil de resistência a antibióticos.....	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
5 CONCLUSÕES.....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
ANEXOS.....	35

RESUMO

HIRSCH, Daniela. Identificação e resistência antimicrobiana de *Aeromonas* móveis provenientes de peixes e ambientes aquáticos. 2004. 42 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*

Espécies de *Aeromonas* móveis são encontradas em ambientes aquáticos, sendo associadas a doenças tanto em peixes quanto em seres humanos, veiculadas a estes por água ou alimento contaminado. No Brasil, ainda não se conhece o perfil de espécies de *Aeromonas* em pisciculturas comerciais. Foram selecionadas oito tilapiculturas localizadas na região do Alto Rio Grande, Minas Gerais, com o objetivo de verificar a diversidade de espécies de *Aeromonas* móveis e seu perfil de susceptibilidade a antibióticos. De cada propriedade foram coletadas três amostras de peixes vivos e em estádio de pré-abate, uma amostra de água do tanque e uma amostra da água de abastecimento do sistema. Diluições seriadas adequadas de cada amostra foram plaqueadas em TSA-ampicilina (10mg/l) e as amostras de rim em ágar sangue de cavalo a 5%. A partir de colônias isoladas positivas para o teste da oxidase foram realizados testes para a identificação do gênero (testes presuntivos) e das espécies de *Aeromonas* (testes bioquímicos). O perfil de antibiograma foi obtido pelo teste de difusão de discos de antibióticos em ágar Mueller Hinton. Foram obtidos 75 isolados diferenciados em nove espécies de *Aeromonas*: *A. jandaei*, *A. hydrophila*, *A. trola*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. eucrenophila*, *A. veronii* bt *veronii*, *A. schubertii* e *A. media*, além de amostras classificadas como *Aeromonas* atípicas. Do total isolado, 8 amostras foram provenientes da superfície corpórea de peixes, 14 da água de distribuição e 53 da água do tanque. Não houve isolamento do parênquima renal. Em relação ao perfil de resistência, 93% dos isolados foram resistente à eritromicina, 36% a tetraciclina, 13% ao ácido nalidíxico, 9% à gentamicina, 8% à nitrofurantoína, 8% à canamicina, 5% à norfloxacina, 4% ao cloranfenicol e 3% às sulfonamidas. Dentre os isolados analisados, 43% apresentaram índice MAR igual ou superior a 22%, ou seja, resistência a duas ou mais drogas das nove testadas.

* Comitê Orientador: Henrique César Pereira Figueiredo - UFLA (Orientador),
Roberta Hilsdorf Piccoli – UFLA (Co-Orientadora)

ABSTRACT

HIRSCH, Daniela. **Identification and antimicrobial resistance of motile *Aeromonas* isolated from fish and aquatic environments.** 2004. 42 p. Dissertation (Master's degree in Food Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG*

Species of *Aeromonas* are found in aquatic environments, which are associated to diseases in both fish and in human beings. These bacteria might be transmitted through water or contaminated food. In Brazil, the profile of these *Aeromonas* species in fish farming is still unknown; therefore, eight commercial producers of tilapia located in the Alto Rio Grande region of Minas Gerais state were selected, with the aim of verifying the diversity of motile *Aeromonas* species and their antibiotic susceptibility profiles. The collected samples were three fish, one sample of pond water and one sample of water used in filling the pond. Suitable dilutions of the washed surface of the fish and water samples were scattered in TSA supplemented with ampicilin (10mg/l). Kidney samples were streaked in Horse Blood Agar. Isolated colonies oxidase positive, were submitted of tests for identification of the species of *Aeromonas* (presumptive and biochemical tests). The antibiogram profile of the isolated samples was obtained through a diffusion test of antibiotic disks in Mueller Hinton Agar. Were obtained 75 different isolates in nine species of *Aeromonas*: *A. jandaei*, *A. hydrophila*, *A. trota*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. eucrenophila*, *A. veronii* *bv veronii*, *A. schubertii*, *A. media*, and samples classified like atypical *Aeromonas*. Of the total isolations, eight samples were taken from the corporal surface of the fish, 14 from the water source and 53 from the pond water. There was no isolation of the renal tissue. In relation to the resistance profile, 93% of the isolated samples were resistant to erythromycin, 36% to tetracycline, 13% to nalidixic acid, 9% to gentamicin, 8% to nitrofurantoin, 8% to kanamycin, 5% to norfloxacin, 4% to chloramphenicol and 3% to sulfonamides. Among the isolated samples analyzed, 42,66% presented a MAR index (Multiple Antibiotic Resistance Index) equal to or superior to 22,2%.

* Guidance committee: Henrique César Pereira Figueiredo – UFLA (Advisor),
Roberta Hilsdorf Piccoli - UFLA (Co-advisor)

1 INTRODUÇÃO

A piscicultura brasileira vem apresentando relativa intensificação da produção nos últimos anos, tendo na tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) uma das principais espécies cultivadas. Supõe-se não haver dados brasileiros a respeito da diversidade de espécies de *Aeromonas* dentro de pisciculturas comerciais, mas sabe-se que alguns fatores podem contribuir para o surgimento da doença, como a alta densidade dentro dos tanques de criação e a associação da alta taxa de matéria orgânica com baixos níveis de oxigênio dissolvido.

Entre os microrganismos patogênicos aos peixes, as *Aeromonas* têm assumido, nos últimos anos, posição importante na frequência de diagnósticos. Ubíquas em ambientes aquáticos, algumas vezes aparecem como agentes primários causadores de lesões em peixes de águas doces.

Além da patogenia em peixes, algumas espécies de *Aeromonas* também podem causar doenças em seres humanos, sendo classificadas pela Organização Mundial de Saúde (2003) como patógenos veiculados pela água e por alimentos contaminados, de interesse emergente à saúde pública. Os sintomas aparecem principalmente sob a forma de gastrinterite, podendo ocorrer peritonite, endocardite, meningite, encefalomielite, septicemia e infecção dos tratos respiratório e urinário, afetando principalmente crianças, idosos e pacientes imunossuprimidos.

O uso de antimicrobianos na prevenção e no tratamento de doenças em pisciculturas tem levado ao aumento global da resistência bacteriana a múltiplas drogas, inclusive entre as espécies de *Aeromonas*. Essa elevação da frequência de múltipla resistência a diferentes antimicrobianos pode estar associada à potencial transferência horizontal de genes de resistência entre bactérias filogeneticamente próximas ou não, tanto em ambientes aquáticos quanto no

intestino do consumidor de peixes contaminados. Este perfil de resistência a antimicrobianos varia de acordo com vários fatores, dentre eles a época e o local de isolamento do microrganismo em estudo.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo o estudo da diversidade de *Aeromonas* em diferentes pisciculturas, caracterizando os microrganismos isolados quanto às espécies e ao perfil de resistência antimicrobiana.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Piscicultura

A criação comercial de peixes tem se desenvolvido bastante em todo o Brasil, com níveis produtivos em ascensão nas regiões Sul, Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e Norte, nesta ordem. Ainda assim, a produção de peixes em cativeiro responde por apenas 12% do total de pescados brasileiros, contra 24% da pesca continental e 64% da pesca marítima (MMA, 2004). Na região Sudeste, o estado de Minas Gerais destaca-se pelo maior número de produtores, perfazendo um total de 10.400 aquícultores, e também pela menor produtividade por hectare (0,41 t/ha), o que se justifica pelo maior número de propriedades com cultivo extensivo (Valenti et al., 2000). Segundo Rasguido & Albanes (2000), o estado de Minas Gerais apresenta condições favoráveis ao desenvolvimento da atividade piscícola, devendo, porém, superar certos pontos que provocam entraves, como o amadorismo dos criadores, o desconhecimento do mercado e a falta de conhecimento técnico para a produção sustentável.

A tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*), apesar de ser uma espécie exótica, é amplamente cultivada em quase todos os estados brasileiros, inclusive em Minas Gerais, onde, juntamente com os peixes redondos, ocupa o primeiro lugar na classificação de espécies criadas comercialmente (Kubitza, 2003). A produção da piscicultura nacional é estimada hoje em torno de 150 mil toneladas/ano e acredita-se que o cultivo de tilápias represente 40% a 45% desta produção (MAA, 2004).

2.2 *Aeromonas*

2.2.1 Taxonomia

Os microrganismos do gênero *Aeromonas* são bastonetes Gram-negativos, oxidase positivos; apresentam motilidade por flagelos polares e laterais (Kirov et al., 2002); não requerem NaCl para o seu crescimento (Pemberton et al., 1997); são ubíquas em ambientes aquáticos e adaptadas ao crescimento em temperatura que varia de 5°C a 37°C (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 1996). O gênero pertence à família *Vibrionaceae*, mas a criação de outra família para o gênero, *Aeromonadaceae*, já foi proposta (Colwell et al., 1986). Porém a primeira classificação é a vigente (Merino et al., 1995; Pemberton et al., 1997; Janda & Abbott, 1998).

Atualmente, segundo o National Center for Biotechnology Information (2004), existem 17 espécies inseridas no gênero *Aeromonas*: *A. allosaccharophila*, *A. bestiarum*, *A. culicicola*, *A. encheleia*, *A. enteropelogenes*, *A. eucrenophila*, *A. guangheii*, *A. hydrophila* (*A. hydrophila* subsp. *dhakensis*, *A. hydrophila* subsp. *hydrophila*, *A. hydrophila* subsp. *ranaei*), *A. jandaei*, *A. media*, *A. popoffii*, *A. caviae*, *A. salmonicida* (*A. salmonicida* subsp. *achromogenes*, *A. salmonicida* subsp. *masoucida*, *A. salmonicida* subsp. *pectinolytica*, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *A. salmonicida* subsp. *smithia*), *A. schubertii*, *A. simiae*, *A. sobria* e *A. veronii* (*A. veronii* bv. *sobria*, *A. veronii* bv. *veronii*).

São consideradas potencialmente patogênicas para os peixes: *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. caviae*, *A. schubertii* e *A. salmonicida*. Essa última espécie é um patógeno primário para peixes, distinto das *Aeromonas* móveis e causador da furunculose. Para os seres humanos as espécies com potencial patogênico são *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. veronii* bt *sobria*, *A. caviae*, *A. veronii* bt *veronii*, *A. schubertii* e *A. jandaei* (OMS, 2003), tendo sido isoladas de diarreia aguda em crianças e de surtos de diarreia em adultos (Taher et al.,

2000). Tanto para peixes quanto para seres humanos, a *Aeromonas hydrophila* é considerada como a espécie mais patogênica dentre as *Aeromonas* móveis (Merino et al., 1995; Janda & Abbott, 1998; Rhodes et al., 2000).

2.2.2 Infecções associadas

As infecções causadas por *Aeromonas* móveis são provavelmente a doença bacteriana mais comum em peixes de água doce (Noca, 1996). Os sinais clínicos da infecção podem variar de lesões de pele superficiais ou profundas a quadros típicos de septicemia. Estas lesões de pele podem se apresentar como áreas de hemorragia e necrose de extensão variada, que podem progredir para úlceras que acometem geralmente o tecido muscular. Nos quadros de infecção sistêmica são observados: exoftalmia, abdômen distendido contendo líquido serosanguinolento e presença de petéquias nas vísceras. Adicionalmente os peixes podem apresentar escurecimento superficial e anorexia. Consideradas como de ocorrência mundial, as infecções por *Aeromonas* móveis possuem como fatores predisponentes diversas condições de estresse as quais podem ser submetidas às populações de peixes, como o excesso de matéria orgânica na água, oxigênio dissolvido abaixo das concentrações adequadas e alta densidade animal. Desse modo, a intensificação dos sistemas de produção colabora definitivamente para a ocorrência de surtos de infecções por *Aeromonas* móveis (Avault, 1995; Hedrick, 1998).

Nos seres humanos, diversas patologias associadas a infecções por *Aeromonas* móveis já foram descritas. Diferentes espécies de *Aeromonas* móveis, com predominância de *A. hydrophila*, foram isoladas de casos de septicemia, síndrome urêmica hemolítica, peritonite, infecções respiratórias e feridas cutâneas. Em vários casos houve a exposição prévia dos pacientes a fontes de água e ou alimentos contaminados (Merino et al., 1995; Nojimoto et al., 1997; Janda & Abbott, 1998; Martins et al., 2002). Casos isolados e surtos

de gastrinterite foram descritos em pacientes de faixas etárias variadas, com concentração de casos em crianças e idosos (Rahman & Willowghby, 1980; Palfreeman et al., 1983; Kokka et al., 1992; Janda & Abbott, 1998).

Com o objetivo de estabelecer os reais atributos patogênicos de bactérias do gênero *Aeromonas* para os seres humanos, vários estudos foram conduzidos para a caracterização de fatores de virulência. *A. hydrophila* pode produzir fimbrias, hemolisinas, enterotoxinas e exoproteases com efeitos patogênicos bem caracterizados *in vitro* (Brown et al., 1997; Handfield et al., 1996; Pemberton et al., 1997; Chopra & Houston, 1999; Kirov et al., 2000; Fivaz et al., 2001; Ghenghesh et al., 2001). Esses diversos fatores não são universalmente produzidos por todas as amostras isoladas de *Aeromonas* sp. e faltam evidências da participação *in vivo* dos mesmos na indução da infecção por *Aeromonas* móveis, principalmente em casos de gastrinterites (Janda & Abbott, 1998).

2.2.3 Ocorrência em alimentos e na água

As *Aeromonas* móveis já foram isoladas de diversas fontes de alimentos. Barnhart & Pancorbo (1992) isolaram *A. hydrophila* no processamento de frangos, obtendo 19 amostras nas carcaças em pré-evisceração, 17 na pós-evisceração, 31 na água de resfriamento, 11 nas carcaças resfriadas e 38 nas carcaças congeladas, perfazendo um total de 116 isolados. Deste total, 63,8% das amostras apresentaram atividade citotóxica. A justificativa dada pelos autores para a prevalência de isolados citotóxicos é que, com a retirada da microbiota natural do frango durante a evisceração, bactérias resistentes a baixas temperaturas multiplicaram-se.

Em abatedouro bovino estudado, Bizani & Brandelli (2001) analisaram 70 amostras da água utilizada na lavagem das carcaças, divididas em água de abastecimento e de escoamento da lavagem. Foram isoladas *Aeromonas* spp. em 21,4% das amostras estudadas, tendo *A. hydrophila* tido os maiores percentuais

de isolamento (11,4% em água de abastecimento e 25,7% em água de escoamento), seguida da *A. sobria*, que foi isolada apenas da água de abastecimento (5,7%). Como foi encontrado resultado positivo para hemólise e hemaglutinação para os isolados, houve o alerta para a contaminação das carcaças por *Aeromonas* sp. potencialmente virulentas.

Estudo feito na cidade do Rio de Janeiro com leite pasteurizado e queijo branco (Freitas et al., 1993) demonstrou a ocorrência de *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila*, *A. atípica* e *A. schubertii* nas amostras de leite e *A. atípica*, *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria* nas amostras de queijo branco. Em relação à expressão de fatores de virulência, 100% dos isolados classificados como *A. hydrophila* produziram hemolisina, 20% e 28,5% das amostras de leite e queijo, respectivamente, produziram enterotoxina termoestável e 80% e 85,7% produziram citotoxina.

Gran et al. (2003), analisando leite cru, leite pasteurizado e soro de leite no Zimbábue, encontraram isolados de *Aeromonas hydrophila* em 5 de 25 amostras testadas. A contaminação do leite foi, supostamente, devido ao contato com água contaminada na ordenha e recontaminação do leite pós-pasteurização.

Na cidade de São Paulo, Saad et al. (1995) analisaram 90 amostras de vegetais comercializados em 20 diferentes mercados. Foram coletadas 30 amostras de alface, 30 de agrião e 30 de escarola. Foram isoladas *Aeromonas* móveis de 47,8% das 90 amostras analisadas, tendo as amostras de agrião tiveram 70% de contaminação positiva, seguidas das amostras de alface, com 43,3% e escarola, com 30%. Das 143 amostras isoladas, 138 (96,5%) foram identificadas como *A. caviae*, 4 (2,8%) como *A. hydrophila* e 1 (0,7%) como *A. atípica*. Como estes vegetais são servidos crus, os autores alertam para o risco da veiculação de patógenos.

Analisando vegetais orgânicos comercializados na Irlanda do Norte, McMahon & Wilson (2001) encontraram espécies de *Aeromonas* em 34% dos

vegetais testados. Entre os vegetais que necessitavam ser minimamente processados antes do consumo, sofrendo lavagem, por exemplo, 41% apresentaram contaminação por *Aeromonas* spp.. As espécies encontradas e suas respectivas freqüências de isolamento foram: *A. schubertii* (21%), *A. hydrophila* (21%), *A. trota* (5,8%) e *A. veronii* bv *veronii* (2,3%). A proibição do uso de sanitizantes químicos no processamento do alimento vegetal orgânico é apontada pelos autores como a principal causa da veiculação de microrganismos potencialmente patogênicos aos consumidores.

Martins et al. (2002) isolaram 99 amostras de espécies de *Aeromonas* a partir de carne, leite e vegetais utilizados pelo restaurante universitário da UNICAMP, em Campinas, SP. Foram encontradas *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae*, *A. salmonicida*, *A. schubertii*, *A. veronii* e *A. jandaei*. 76% dos isolados apresentaram atividade citotóxica e nas amostras de *A. veronii* e *A. salmonicida* a toxina aerolisina foi mais comumente encontrada que nas amostras de *A. hydrophila*, *A. sobria* e *A. Caviae*. As amostras de *A. jandaei* e *A. schubertii* não expressaram a toxina.

Sugita et al. (1995) isolaram espécies *Aeromonas* de peixes, da água e de sedimento do Rio Hikiji, no Japão, encontrando *A. veronii*, *A. caviae*, *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. jandaei* e *Aeromonas* spp.. Segundo os autores, *A. veronii* está amplamente distribuída no ambiente aquático, possuindo potencial para assumir maiores valores de UFC/mL de conteúdo intestinal de peixes em relação a outras espécies comumente isoladas.

Em um estudo realizado por Vivekanandhan et al. (2002) em Coimbatore, no Sul da Índia, 319 amostras de *Aeromonas hydrophila* foram isoladas a partir de 536 peixes e 278 lagostas coletadas no maior mercado de peixes da cidade. As amostras analisadas foram superfície corpórea, conteúdo intestinal e brânquias.

Avaliando a presença de espécies de *Aeromonas* em 87 amostras de peixes comercializados na Malásia, Radu et al. (2003) encontraram 60 isolados, sendo 55% de *A. veronii* biovar *sobria*, 11,5% de *A. hydrophila* e 2,3% de *A. caviae*. Destes isolados, 90% foram positivos para a atividade hemolítica, demonstrando o potencial patogênico das espécies isoladas.

Pettibone et al. (1996) isolaram *Aeromonas hydrophila* e *A. sobria* das vísceras e superfícies corpórea de peixes coletados no Rio Búfalo, em Nova Iorque. Da mesma maneira, Sousa & Silva-Souza (2001) isolaram *Aeromonas* sp. da superfície corpórea de peixes e da água do Rio Congonhas, no Paraná, sem, contudo, proceder à identificação das espécies. Ghenghesh et al. (2001) isolaram espécies de *Aeromonas* em 487 de 1000 amostras de água para bebida não tratada na Índia, encontrando 59% de *A. hydrophila*, 27% de *A. caviae*, 11% de *A. sobria* e 3% *A. atípicas*.

González et al. (2001) isolaram *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. caviae*, *A. eucrenophila*, *A. veronii* bt *sobria*, *A. jandaei* e *A. schubertii* de peixes e da água, tanto de rios quanto de pisciculturas. Os animais coletados foram posteriormente resfriados com gelo a 0°C e mantidos a esta temperatura por 15 dias. No decorrer deste período, foi mensurada a população de *Aeromonas* e os autores relataram que *A. hydrophila* e *A. veronii* bt *sobria* obtiveram as maiores taxas de multiplicação no alimento. Os isolados demonstraram ser produtores de lipases, proteases e ácido sulfídrico, agentes químicos deterioradores de alimentos em geral.

Espécies de *Aeromonas* já foram isoladas, tanto de água não tratada quanto de água clorada, o que sugere a resistência das mesmas aos processos convencionais de descontaminação (Handfield et al., 1996). Além das fontes de água, as carcaças de peixes são potencialmente carreadoras de *Aeromonas* sp. (ICSMF, 1996). Considerando-se a atual carência de unidades de abate e

processamento de peixes no Brasil, o risco de contaminação e veiculação de *Aeromonas* para seres humanos pode ser elevado.

2.2.4 Resistência a antimicrobianos

Outro aspecto importante e pouco conhecido para as bactérias do gênero *Aeromonas* é a variação dinâmica do perfil de sensibilidade a diferentes antibióticos e quimioterápicos. De modo geral, o gênero é resistente à ampicilina e sensível à tetraciclina. A resistência aos antimicrobianos pode ser cromossômica, como no caso da ampicilina e das quinolonas, ou adquirida por meio de elementos genéticos móveis, como plasmídeos de resistência transferíveis entre bactérias filogeneticamente próximas ou não e transposons, integrons e bacteriófagos (Noga, 1996; Pavanelli et al., 1998, Schmidt, 2001). Krumperman (1983) e Vivekanandhan (2002) afirmam que quanto maior o número de antimicrobianos aos quais um determinado isolado bacteriano é resistente, maior a chance desta resistência ser transferível, já que um mesmo plasmídeo R pode conter vários genes de resistência.

Banhart & Pancorbo (1992), analisando 119 isolados de *Aeromonas hydrophila* de um abatedouro de aves, demonstraram que 46,2% das amostras apresentaram resistência múltipla a antimicrobianos. Relatos mostram que o perfil de resistência pode variar de acordo com a região geográfica em estudo, com as diferentes fontes de isolamento (água, efluentes, hospedeiros animais e seres humanos), além da época de isolamento. Isolados de surtos podem ter valores de resistência superestimados, devido ao fato de haver, preferencialmente, apenas um agente envolvido (Motyl et al., 1985; Falcão et al., 1998; Schmidt et al., 2000; Ghenghesh et al., 2001). Recentemente tem sido demonstrado, na Europa, que a frequência de resistência à oxitetraciclina, um dos antimicrobianos de maior utilização na piscicultura, tem aumentado em isolados de *Aeromonas hydrophila* (Schmidt et al., 2000), tendo sido



descobertas, inclusive, características novas na transmissão de genes de resistência, com o envolvimento de transposons e integrons (Schmidt et al., 2001). Son et al. (1997) caracterizaram o perfil de resistência de 21 isolados de *Aeromonas hydrophila* obtidos a partir de lesões ulcerativas da superfície de tilápias criadas na Malásia, obtendo 57% das amostras resistentes à estreptomicina, 48% à tetraciclina, 43% à eritromicina e 100% sensíveis à gentamicina. Como um mesmo isolado apresentou resistência a pelo menos duas drogas, ficou caracterizada a resistência a múltiplos antimicrobianos.

Saha & Pal (2002), estudando a susceptibilidade de 16 isolados bacterianos obtidos em surtos da síndrome ulcerativa epizoótica (EUS) em pisciculturas indianas, encontraram 100% das amostras de *Aeromonas* resistentes à penicilina, à ampicilina e à eritromicina. Foram testadas 12 drogas: amoxicilina, ampicilina, cloranfenicol, co-trimoxazole, eritromicina, gentamicina, canamicina, ácido nalidíxico, norfloxacin, oxitetraciclina, penicilina e estreptomicina. Pelo teste de habilidade de indução de úlcera, uma amostra de *A. hydrophila* foi considerada não patogênica, sendo, contudo, resistente a todas as 12 drogas testadas, demonstrando um fenômeno conhecido como múltipla resistência a antimicrobianos.

Estudando a susceptibilidade a antimicrobianos do total de 319 amostras de *Aeromonas hydrophila* isoladas de peixes e lagostas comercializadas em um mercado indiano, Vivekanandhan et al. (2002) demonstraram que 95% das amostras foram resistentes a bacitracina, eritromicina, neomicina, novobiocina, polimixina B e rifampicina. Porém, valores bem diferentes foram encontrados para o cloranfenicol (3,7%), gentamicina (7,5%), estreptomicina (8,7%) e ácido nalidíxico (16,9%); 51,4% das amostras foram resistentes à tetraciclina e 31,3% das amostras foram multirresistentes a 10 dos 15 antimicrobianos testados; 26,1% foram multirresistentes a 11 drogas, 17,5% das amostras a 9 bases e 10,4% multirresistentes a 12 dos 15 antimicrobianos.

Radu et al. (2003) avaliaram a presença de espécies de *Aeromonas* em amostras de peixes comercializados na Malásia e verificaram o perfil de resistência de 60 isolados aos seguintes antimicrobianos: ampicilina, bacitracina, carbenicilina, cefoperazona, ceftriaxona, cefalotina, ceftazidime, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, canamicina, ácido nalidixico, norfloxacina, estreptomicina e tetraciclina. Todos os isolados apresentaram resistência a três ou mais antimicrobianos testados, porém, nenhum isolado foi resistente à ceftazidime. Como esperado, todas as amostras foram resistentes à ampicilina. Foi encontrada alta frequência de resistência à carbenicilina, eritromicina e estreptomicina.

Tem sido demonstrada também a transferência natural de genes de resistência à oxitetraciclina de amostras de *Aeromonas* provenientes de ambientes de aquicultura para outras bactérias de ambientes hospitalares (Rhodes et al., 2000). Ko et al. (1996), estudando o perfil de resistência a vários antimicrobianos de 234 isolados de *Aeromonas* extraídas em casos clínicos humanos de hospitais tailandeses, encontraram, principalmente, resistência à tetraciclina e à associação trimetoprim-sulfamethoxazole. A resistência as cefalosporinas e aos aminoglicosídeos foi encontrada de forma mais abrangente entre as espécies tailandesas que aquela encontrada em isolados norte-americanos e australianos, demonstrando a variação da frequência de resistência entre os diferentes locais de isolamento.

Trabalhando com 107 isolados de *Aeromonas* obtidos em fezes diarreicas de hospitais indianos, Chaudhury et al. (1996) encontraram 88,9% resistentes à ampicilina, 75% à cefalexina, 73,2% à cefalotina, 61,1% à eritromicina e 35,2% à cefoxitina. Curiosamente, todos os isolados foram sensíveis à tetraciclina, neomicina, gentamicina e ciprofloxacina. Pettibone et al. (1996), pesquisando 74 amostras de *Aeromonas* isoladas a partir de *Ictalurus nebulosus* nos Estados Unidos, encontraram 97% dos isolados resistentes ao

rifampin, 96% à novobiocina e 85% à vancomicina, caracterizando, novamente, um quadro de multirresistência entre as espécies de *Aeromonas*, em que as amostras isoladas foram resistentes a, pelo menos, duas drogas testadas.

Goñi-Urriza et al. (2000) isolaram *Aeromonas* e enterobactérias da água do rio Arga, na Espanha e compararam os perfis de resistência a antimicrobianos dos isolados. A maioria das amostras de *Aeromonas* (72%) e 20% das enterobactérias foi resistente ao ácido nalidíxico, 27,5% das *Aeromonas* foram resistentes à tetraciclina e 26,6% ao co-trimoxazole. Esta elevada frequência de resistência ao ácido nalidíxico, segundo os autores, não foi um resultado esperado, devido ao fato de a resistência as quinolonas, dentre elas o ácido nalidíxico, ser cromossômica, não podendo ser mobilizada entre bactérias. Apesar das limitadas trocas de genes de resistência às quinolonas entre enterobactérias e *Aeromonas* neste experimento, esta resistência as quinolonas provavelmente ocorreu devido a fortes descargas de antimicrobiano de origem desconhecida sobre o efluente urbano, gerando seleção dos isolados aquáticos resistentes ao ácido nalidíxico.

Ainda não há consenso na literatura a respeito da origem da resistência a diferentes antimicrobianos entre espécies de *Aeromonas*. Sabe-se que a resistência aos β -lactâmicos, como a ampicilina e a penicilina é cromossômica, assim como aquela às quinolonas, como o ácido nalidíxico e a norfloxacin (Ko et al., 1996; Chang & Bolton, 1987). Esta resistência as quinolonas é devido tanto à seleção de mutantes resistentes à droga (Goni-urriza, 2000) quanto à dissipação de clones resistentes, como foi bem caracterizado no estudo feito por Klugman (2003). Como o alvo de ação das quinolonas em bactérias Gram-negativas é a DNA-girase, interferindo negativamente na replicação do DNA bacteriano, a resistência a estas bases está associada a mutações nos genes que codificam esta enzima, ou em genes que codificam porinas ou ainda genes envolvidos em mecanismos de efluxo de compostos tóxicos (Hawkey, 2003).

Estes mecanismos de efluxo, denominados “sistemas MDR” (sistemas de multirresistência a drogas), estão envolvidos em processos de resistência bacteriana a vários antimicrobianos, devido ao fato de que, por serem pouco seletivos em relação ao agente tóxico a ser eliminado da célula, um mesmo sistema é capaz de livrar a célula bacteriana de vários antimicrobianos (Díaz, 2003).

Considerando-se ainda a necessidade mundial de monitoramento da resistência a antimicrobianos entre bactérias patogênicas de ambientes aquáticos (Smith, 2001) para uma definição mais adequada das medidas de controle de doenças e difusão de resistência microbiana, fica clara a importância, para a piscicultura brasileira, do desenvolvimento de estudos nesse campo, que abrange não somente aspectos da doença, mas também a segurança alimentar para seres humanos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção das pisciculturas

Foram selecionadas oito pisciculturas de recria e engorda de tilápias (*Oreochromis niloticus*), localizadas na região do Alto Rio Grande, Sul de Minas Gerais. Todas as propriedades selecionadas adotam o mesmo sistema de produção em tanques de terra, com fornecimento de ração comercial. Em cada propriedade foi aplicado questionário (em anexo) para a coleta de dados sobre o manejo sanitário geral do plantel, incluindo a origem dos peixes, cuidados sanitários à introdução de novos animais, tipos de medicamentos e desinfetantes utilizados, com esquema terapêutico e frequência de uso, principais doenças ocorrentes e as características observadas nas mesmas, além de formas e frequência de monitoramento da qualidade da água. As propriedades foram classificadas de A a H.

3.2 Coleta das amostras para o isolamento de *Aeromonas*

De cada tanque foram coletados 500 mL de água do tanque e 500mL da água de abastecimento (afluente do tanque), ambos em frasco estéril, para análise microbiológica. O material coletado foi transportado para o laboratório a 4°C e analisado no mesmo dia. Do tanque de cultivo foram capturados três peixes, transportados vivos e a temperatura ambiente até o laboratório, acondicionados em caixa apropriadas com água do tanque. Antes dos procedimentos laboratoriais os peixes foram submetidos à eutanásia por choque térmico em caixa de isopor com água e gelo, como recomendado por Noga (1996).

3.3 Isolamento das espécies de *Aeromonas*

3.3.1 Isolamento de *Aeromonas* das amostras de água do tanque e de abastecimento

O isolamento foi feito mediante diluições seriadas das amostras de água do tanque e da água de abastecimento, sendo as diluições adequadas plaqueadas em ágar soja tripticaseína (TSA, Biolife, Itália) suplementado com ampicilina (Sigma, USA) na concentração de 10mg/L e incubadas a 30°C por 22 a 26 horas. Das placas adequadas (30 a 300 colônias por placa), 10 colônias de morfotipos diversos foram testadas para o teste de oxidase e aquelas consideradas positivas foram repicadas para placas de petri contendo TSA, para posterior análise pelos testes presuntivos e confirmativos para *Aeromonas*.

3.3.2 Isolamento de *Aeromonas* da superfície das tilápias

Após a eutanásia, as tilápias foram acondicionados em sacos plásticos esterilizados contendo água peptonada 0,1% estéril, sendo a amostragem realizada pela metodologia de rinsagem ou lavagem superficial (Harrigan, 1998). O lavado foi submetido a diluições seriadas e alíquotas de 0,1 mL das diluições adequadas foram semeadas em placas de petri contendo TSA-ampicilina na concentração de 10mg/L e incubadas a 30°C por 22 a 26 horas. Das placas adequadas (30 a 300 colônias por placa), 10 colônias de morfotipos diversos foram testadas para o teste de oxidase e aquelas consideradas positivas foram repicadas para placas de petri contendo TSA, para posterior análise pelos testes presuntivos e confirmativos para *Aeromonas*.

3.3.3 Isolamento de *Aeromonas* do rim das tilápias

A obtenção asséptica de amostras de rim de cada peixe foi realizada seguindo as recomendações de Noga (1996) e do Office International des Epizooties (OIE, 2003). Após o lavado superficial, foi realizada a remoção

mecânica das escamas da região dorsal e desinfecção com álcool iodado. Foi feita uma incisão transversal na porção dorsal média e a coleta do rim realizada assepticamente por “swab”, semeado em ágar sangue (sangue equino a 5%) e incubado a 30°C, por 22 a 26 horas. Todas as colônias isoladas foram repicadas para placas de petri contendo TSA, para posterior análise pelos testes presuntivos e confirmativos para *Aeromonas*.

3.4 Identificação das espécies de *Aeromonas*

Para validação da metodologia de identificação, foi utilizada a amostra de referência *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966. A identificação seguiu o padrão da Tabela 1, em anexo.

3.4.1 Identificação presuntiva

As análises presuntivas para o gênero foram feitas pelos testes de coloração de Gram, morfologia, catalase e fermentação da dextrina. Para o teste de fermentação de dextrina foi utilizado o caldo base Phenol Red (Biolife, Itália) acrescido de 1% de dextrina P.A., sendo a incubação por 24 a 48 horas e a temperatura de 30°C.

3.4.2 Identificação bioquímica

Os testes para identificação das espécies de *Aeromonas* móveis foram realizados sobre os isolados classificados como cocobastonetes Gram-negativos, catalase positivos e fermentadores de dextrina. Foram realizados os testes: motilidade, fermentação de glicose, sacarose, manitol, salicina, trealose e arabinose, hidrólise de esculina, produção de acetoina e utilização dos aminoácidos lisina, arginina e ornitina (Bergey's Manual, 1984; Janda & Abbott, 1998). Para os testes de fermentação de carboidratos foi utilizado o caldo base Phenol Red (Biolife, Itália), suplementado com 1% do devido carboidrato, com

exceção do manitol, que foi suplementado a 0,5%. O tempo de incubação foi de 24 a 48 horas e a temperatura de 30°C (Mac Faddin, 1980). Para o teste da hidrólise de esculina utilizou-se o caldo base acrescido de esculina, indicado por Qüinn et al. (1994), com incubação a 30°C por 3 dias. No caso da verificação da produção de acetoina, o meio de cultura utilizado foi o caldo Voges-Proskauer, com incubação a 30°C, por 5 dias, segundo Mac Faddin (1980). Para o teste de utilização de aminoácidos, o meio utilizado foi o caldo base Descarboxylase Moeller (Biolife, Itália), suplementado com 1% de cada aminoácido e incubado a 30°C por 24 a 48 horas (Mac Faddin, 1980). Os isolados que apresentaram variação em pelo menos três testes bioquímicos de identificação da espécie para a grade foram considerados *Aeromonas* atípicas (Freitas et al., 1993; Saad et al., 1995).

3.5 Perfil de resistência aos antimicrobianos

O perfil de resistência aos antimicrobianos foi determinado pelo método de difusão de discos de antimicrobianos (método de Bäuer-Kirby), utilizando-se o ágar Mueller Hinton (Merck, USA) (NCCLS, 1990). Foram utilizados discos de papel de filtro (Cecon, Brasil) com os seguintes antimicrobianos: gentamicina 10µg, tetraciclina 30µg, eritromicina 15µg, sulfonamidas 300µg, ácido nalidíxico 30µg, cloranfenicol 30µg, nitrofurantoína 300µg, canamicina 30µg e norfloxacina 10µg. Para a validação da metodologia foram testadas as amostras de referência *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Os antimicrobianos foram selecionados devido ao fato de serem quimicamente diversos, com espectro de ação diferenciado entre si (com exceção das quinolonas ácido nalidíxico e norfloxacina que pertencem ao mesmo grupo, mas possuem gerações diferentes).

A partir dos resultados dos antibiogramas, o índice de resistência a múltiplos antimicrobianos (índice MAR) foi calculado como o número de

drogas ao qual determinado isolado foi resistente sobre o número total de drogas (nove, neste caso), multiplicando-se o valor encontrado por cem, para que fossem obtidos valores em percentagem (Krumperman, 1983).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as oito propriedades estudadas apresentavam condições similares de manejo, utilizando ração comercial e a compra de alevinos de empresas multiplicadoras localizadas no estado de Minas Gerais, com exceção da propriedade C, que produzia seus próprios alevinos. Em nenhuma das propriedades foi registrada a presença de doenças nos plantéis e nem o uso de antimicrobianos. Com exceção da propriedade C, nenhuma das propriedades informou o uso do controle de qualidade da água (pH, oxigênio dissolvido e temperatura). Em todas as propriedades, a água de abastecimento do sistema foi proveniente de nascentes.

De todas as propriedades coletadas houve isolamento de, pelo menos, duas espécies de *Aeromonas* (Tabela 2). Foram feitos 75 isolamentos diferenciados em nove espécies móveis: *Aeromonas jandaei* (26,67%), *A. hydrophila* (25,33%), *A. atípica* (18,67%), *A. trota* (10,67%), *A. caviae* (6,67%), *A. sobria* (4%), *A. eucrenophila* (2,67%), *A. veronii* bt *veronii* (2,67%) e *A. schubertii* (1,33%), além de uma espécie não-móvel: *A. media* (1,33%).

Do total isolado, 14 (19%) isolados foram provenientes da água de abastecimento (oito identificados como *A. hydrophila*, quatro como *A. atípica*, uma como *A. jandaei* e uma como *A. eucrenophila*); 53 (70%) isolados da água do tanque (dezesseis identificados como *A. jandaei*, onze como *A. hydrophila*, dez como *A. atípica*, cinco como *A. trota*, cinco como *A. caviae*, dois como *A. veronii* bt *veronii* e um isolado de cada espécie: *A. eucrenophila*, *A. media*, *A. sobria* e *A. schubertii*) e 8 (11%) oriundos da superfície corpórea de peixes (*A. trota*, três isolados; *A. jandaei*, três isolados e *A. sobria*, dois isolados). Não houve isolamento a partir do parênquima renal.

TABELA 2 Espécies de *Aeromonas* isoladas a partir de peixes e de ambientes de cultivo de tilápias

Espécies	Propriedades								Total
	A	B	C	D	E	F	G	H	
<i>A. jandaei</i>	2	2	3	3	1	3	3	3	20
<i>A. hydrophila</i>	6	0	1	0	3	1	4	4	19
<i>A. atípica</i>	1	0	1	0	2	2	4	4	14
<i>A. trota</i>	2	1	1	0	0	3	1	0	8
<i>A. caviae</i>	0	0	0	0	0	5	0	0	5
<i>A. sobria</i>	0	0	2	0	1	0	0	0	3
<i>A. eucrenophila</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	2
<i>A. veronii</i>	0	0	0	1	1	0	0	0	2
<i>A. media</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>A. schubertii</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Total	12	4	9	4	8	14	12	12	75

A ampla distribuição de diferentes espécies entre as propriedades estudadas é relevante, devido ao fato de terem sido encontradas espécies potencialmente patogênicas aos peixes (*A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. caviae*, *A. schubertii*), o que, perante o manejo inadequado da piscicultura gera o risco de surgimento de doenças. Foram isoladas também espécies potencialmente patogênicas a seres humanos (*A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae*, *A. veronii* *bt veronii*, *A. schubertii*, e *A. jandaei*), implicando em risco ao consumidor. Além disso, isolados não-patogênicos porém potenciais transferidores de genes de resistência para outras bactérias também foram isolados (*A. media*, *A. trota* e *A. eucrenophila*).

A diversidade de espécies isoladas da água de abastecimento encontra-se de acordo com dados obtidos anteriormente por Chaudhury et al. (1996) e Ghenghesh et al. (2001) que, no entanto, estudaram água de rio. Como foram isoladas espécies com potencial patogênico aos peixes, estima-se que a água de abastecimento pode estar funcionando como veículo de doenças aos plantéis. Das amostras de água dos tanques de criação foram obtidos não somente o maior percentual de isolamento, como também a maior diversidade de espécies isoladas, fato este confirmado em estudos anteriores (Sugita et al., 1995; González et al., 2001). Das três espécies isoladas da superfície corpórea dos peixes, nenhuma é patogênica para os mesmos, mas sabe-se que *Aeromonas sobria* e *A. jandaei* possuem potencial patogênico para seres humanos (OMS, 2003), o que representa risco de contaminação do pescado durante o abate e, conseqüentemente, do consumidor. *Aeromonas hydrophila* é a espécie mais associada a infecções em organismos aquáticos e a sua baixa freqüência de isolamento da superfície corpórea dos peixes analisados neste experimento pode ser devido ao histórico de ausência de doenças nos plantéis avaliados.

Em relação ao perfil de resistência, 70 isolados do total obtido foram resistentes à eritromicina, 27 isolados à tetraciclina, dez isolados ao ácido nalidixico, sete isolados à gentamicina, seis isolados à nitrofurantoína, seis isolados à canamicina, quatro isolados à norfloxacina, três isolados ao cloranfenicol e dois isolados às sulfonamidas, conforme descrito na Figura 1.

A elevada freqüência de resistência para eritromicina está de acordo com a citada na literatura (Chaudhury et al., 1996; Pettibone et al., 1996; Saha & Pal, 2002; Radu et al., 2003). Porém, trabalhos anteriores a este indicam uma alta freqüência de resistência à tetraciclina e mediana à gentamicina e à canamicina entre amostras de *Aeromonas* (Son et al., 1997; Ghenghesh et al., 2001; Vivekanandhan et al., 2002), o que não ocorreu neste experimento, provavelmente devido à não utilização de antimicrobianos como profilaxia ou

DANIELA OLIVEIRA CARNEIRO

**AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
POPULAÇÕES BACTERIANAS RESISTENTES
A ANTIBIÓTICOS ISOLADAS EM DIFERENTES
SISTEMAS DE CULTIVO DE TILÁPIA DO NILO
(*Oreochromis niloticus*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação “Stricto Sensu” em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de “Mestre”.



Orientador
Professor Henrique César Pereira Figueiredo

LAVRAS
MINAS GERAIS-BRASIL
2005

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA

Carneiro, Daniela Oliveira.

Avaliação e caracterização de populações bacterianas resistentes a antibióticos isoladas em diferentes sistemas de cultivo de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) / Daniela Oliveira Carneiro. – Lavras : UFLA, 2005.

60 p. : il.

Orientador: Henrique César Pereira Figueiredo.

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Tilápia do Nilo. 2. Resistência a antibiótico. 3. Bactéria. 4. Sistema de cultivo. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-639.3758

DANIELA OLIVEIRA CARNEIRO

**AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE POPULAÇÕES
BACTERIANAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS ISOLADAS
EM DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO DE TILÁPIA DO
NILO (*Oreochromis niloticus*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação “Stricto Sensu” em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 04 de julho de 2005

Profa. Dra. Priscila Vieira Rosa Logato

UFLA

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Picolli

UFLA

Profa. Dra. Rosane de Freitas Schwan

UFLA


Prof. Henrique César Pereira Figueiredo.
UFLA
(Orientador)

**LAVRAS
MINAS GERAIS-BRASIL
2005**

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, por me ajudar a cumprir mais esta etapa.
Aos meus pais, José Danilo e Isa, pelo apoio, amor e exemplo de vida.
Ao meu irmão, Daniel, pelo carinho e amor sempre a mim dedicados.
Ao meu namorado, Bruno, pelo apoio e dedicação em todos os momentos.
Ao meu orientador, Professor Henrique César Pereira Figueiredo, pela amizade, confiança e oportunidade de buscar novos conhecimentos.
Aos amigos Delton, Dircéia e Luiza, pelo auxílio na execução do experimento.
Aos amigos do Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos, Carlos, Daniela Hirsch, Daniela Tupy, Delton, Dircéia, Flaviane, Gláucia, Halan, Luciano, Rejeana e aos Professores do DMV, Geraldo Márcio da Costa e Adriana Mello Garcia Rabelo, pela amizade, apoio e incentivo.
À Professora Roberta Hilsdorf Picolli, pela orientação e apoio.
Ao professor Júlio S. de S. Bueno Filho (DEX) e à Andréa Cristiane dos Santos (Doutoranda-DEX), pela realização das análises estatísticas.
Às professoras Rosane Freitas Schwan e Priscila Rosa Vieira Logato, membros da banca de avaliação, pela atenção e disponibilidade.
Aos funcionários do Setor de Piscicultura DZO – UFLA, Leandro e Eleci, e a Jodnes, pelo auxílio na realização das coletas
Ao Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos do DMV – UFLA, pela infraestrutura para a realização das análises do experimento.
Ao setor de Piscicultura do DZO-UFLA, pela disponibilidade para a realização da coleta de amostras.
À FAPEMIG, pelo apoio financeiro.
A todas as pessoas, não mencionadas, que fazem parte da minha vida.
Meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Produção e consumo do pescado.....	3
2.2 Uso de dejetos de animais na aquicultura.....	5
2.3 Microbiota e contaminação do pescado.....	7
2.4 Resistência bacteriana a antibióticos.....	9
2.5 Desenvolvimento de resistência bacteriana a antibióticos na aquicultura.....	13
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Delineamento experimental.....	16
3.2 Sistemas de cultivo de tilápias do nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	17
3.3 Amostras coletadas.....	17
3.3.1 Água de abastecimento e do tanque.....	18
3.3.2 Ração e adubo orgânico.....	18
3.3.3 Peixes.....	18
3.4 Quantificação das populações bacterianas.....	18
3.4.1 Meios de cultura e condições de cultivo.....	18
3.4.2 Água do tanque e de abastecimento.....	19
3.4.3 Ração e adubo orgânico.....	19
3.4.4 Microbiota da superfície das tilápias.....	20
3.4.5 Conteúdo intestinal.....	20

3.5 Análise qualitativa.....	20
3.5.1 Identificação das principais famílias bacterianas.....	20
3.5.2 Perfil de resistência a antibióticos.....	21
3.5.3 Perfil de múltipla resistência a antibióticos.....	21
3.6 Análise estatística.....	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1 Populações bacterianas resistentes isoladas dos diferentes sistemas de cultivo analisados.....	23
4.2 Frequência de famílias bacterianas nos diferentes sistemas de cultivo analisados.....	39
4.3 Perfil de resistência a antibióticos.....	41
4.4 Perfil de múltipla resistência a antibióticos.....	45
5 CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
ANEXOS.....	59

RESUMO

CARNEIRO, Daniela Oliveira. **Avaliação e caracterização de populações bacterianas resistentes a antibióticos isoladas em diferentes sistemas de cultivo de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*)** Lavras: UFLA, 2005. 56 p. (Dissertação – Mestrado em Ciência dos Alimentos)¹

O objetivo deste trabalho foi verificar a diversidade de resistência a antibióticos em populações bacterianas oriundas de diferentes sistemas de cultivo de tilápias, sem utilização prévia de antibióticos: sistema 1 (tanque de alvenaria com arraçoamento), sistema 2 (tanque de terra com arraçoamento), sistema 3 (tanque de terra com adubação orgânica). Para análise de cada sistema, foram capturados três peixes, em estágio de pré-abate, com peso médio de 300 gramas, e coletadas amostras de conteúdo intestinal e lavado de superfície dos mesmos, água de abastecimento, água do tanque e ração ou adubo orgânico. As amostras foram submetidas à quantificação de populações bacterianas totais e resistentes a ampicilina, cloranfenicol, norfloxacin e tetraciclina. Colônias representativas dessas populações foram identificadas pelos testes de gram, catalase, oxidase e oxidação-fermentação. Noventa e oito amostras selecionadas foram submetidas ao teste de antibiograma, utilizando-se os seguintes antibióticos: ampicilina, cefuroxima, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, nitrofurantoína, norfloxacin, sulfonamidas e tetraciclina. As populações bacterianas apresentaram-se mais altas no sistema 3 ($P= 0,0507$), seguidas pelas do sistema 1 e foram mais baixas no sistema 2 ($P< 0,01$). O adubo apresentou percentuais de recuperação de bactérias resistentes mais elevados e maior número de bactérias, se comparado às outras amostras ($P<0,01$). As populações bacterianas resistentes à norfloxacin foram superiores em todas as amostras avaliadas quando comparadas às de conteúdo intestinal ($P<0,01$). Os percentuais de recuperação de bactérias resistentes a antibióticos foram, de modo geral, elevados para ambientes sem uso destas drogas. Membros das famílias Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae e Vibrionaceae predominaram nos sistemas 1 e 2, enquanto no sistema 3 houve predomínio das famílias Micrococcaceae e Vibrionaceae. A maioria dos isolados foi resistente a ampicilina e eritromicina e susceptíveis a norfloxacin e gentamicina. Dentre os 98 isolados, 96% apresentaram índice MAR maior ou igual a 0,2, o que indica multirresistência e o MAR médio dos três sistemas foi igual a 0,4. Portanto, os sistemas de cultivo analisados constituem fontes de alto risco para manutenção e disseminação de resistência bacteriana a diversos antibióticos.

¹Comitê orientador: Henrique César Pereira Figueiredo – UFLA (orientador) e Roberta Hilsdorf Piccoli- UFLA (co-orientadora)

ABSTRACT

Carneiro, Daniela Oliveira. **Evaluation and characterization of antibiotic resistant bacterial populations from different Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) culture systems.** Lavras: UFLA, 2005. 56 p. Dissertation (Master degree in Food Science)²

The aim of this work was to verify the antibiotic resistance diversity in bacterial populations from different Nile tilapia culture systems: system 1 (concret pond and commercial pelleted feed), system 2 (land pond and commercial pelleted feed) and system 3 (land pond and animal manure). For each farm analysis, were captured three tilapia and collected their intestinal content and surface mucus, influent water, pond water and pelleted feed or animal manure. Viable total bacteria and antibiotic resistant bacteria counts were performed by spread plate method in tryptic soy agar supplemented with ampicillin, chloramphenicol, norfloxacin and tetracycline. The main bacterial populations were identified by Gram stain, catalase, oxidase and oxidation-fermentation tests. 98 bacterial strains were subjected to sensitivity testing against ampicillin, cefuroxime, chloramphenicol, erythromycin, gentamicin, norfloxacin, nitrofurantoin, sulfonamides and tetracycline. Total bacterial populations were smaller in farm 2 ($P < 0,01$) than farm 1. Bacterial populations in farm 3 were higher than farm 1 ($P = 0,0507$). Animal manure showed high number of total and resistant bacteria, when compared with other samples ($P < 0,01$). Intestinal content didn't show resistant bacteria to norfloxacin ($P < 0,01$). The recovery of resistant bacteria was considerate elevated for the analysed systems. Vibrionaceae, Enterobacteriaceae and Pseudomonadaceae were most prevalent in farms 1 and 2. But, in farm 3, Micrococcaceae and Vibrionaceae were most prevalent. The main bacterial strains were resistant to ampicillin and erythromycin, but resistance to norfloxacin and gentamicin were uncommon. Among 98 bacterial isolates, 96% were resistant to two or more antibiotics. The multiple antibiotic resistance index was determined and it was similar for all systems analyzed ($MAR = 0,4$), indicating a high risk source for multiple antibiotic resistance.

² Guidance committee: Henrique César Pereira Figueiredo – UFLA (advisor) and Roberta Hilsdorf Piccoli- UFLA (co-advisor)

I INTRODUÇÃO

A aqüicultura brasileira tem apresentado altas taxas de crescimento, estimadas em 30% ao ano, apesar de estar concentrada em pequenas propriedades. A piscicultura de água doce está presente em todos os estados do Brasil, destacando-se como responsável pela maior parte da produção da aqüicultura.

Diferentes sistemas são utilizados para o cultivo do pescado no Brasil, como, por exemplo, os constituídos por tanques de alvenaria ou de terra. O tanque de alvenaria pode reduzir a contaminação do pescado, visto que o solo apresenta grande diversidade de microrganismos que podem levar à elevada densidade de populações bacterianas presentes no ambiente de cultivo. Porém, tanques de alvenaria elevam a dureza da água e, por isso, são menos utilizados. Outra fonte de contaminação do ambiente de cultivo do pescado é a utilização de dejetos de animais para a adubação dos tanques de criação, a fim de reduzir os custos de produção. Os excrementos de animais podem carrear resíduos de antibióticos ou bactérias resistentes a essas drogas para o ambiente aquícola. A presença de resíduos de antibióticos favorece a seleção de bactérias resistentes que podem se inserir na cadeia alimentar humana por meio do pescado contaminado e transferir genes de resistência às bactérias da microbiota ou potencialmente patogênicas para seres humanos. O potencial de cada um dos sistemas de cultivo, em relação à capacidade de albergar bactérias resistentes a antibióticos e contribuir para disseminação de genes bacterianos de resistência, ainda não está bem estabelecido.

O fato da produção de pescado estar concentrada em pequenas propriedades, predominando o abate artesanal, e a falta de fomento para a atividade são responsáveis pela qualidade deficiente do pescado que chega ao

consumidor. O pescado pode veicular diversos microrganismos patogênicos e bactérias resistentes a antibióticos para o homem. Dentre as principais doenças veiculadas pelo pescado estão as toxinfecções bacterianas, decorrentes da contaminação no ambiente hídrico ou durante o processamento pós-despesca.

Além disso, o uso de agentes antimicrobianos em qualquer etapa da produção de alimentos representa um sério risco para o consumidor e, conseqüentemente, um grave problema de saúde pública mundial. Essa preocupação tem levado a diversos estudos sobre os mecanismos pelos quais a resistência a antibióticos tem se disseminado entre as diferentes populações bacterianas. Porém, poucos trabalhos têm avaliado a ocorrência de bactérias resistentes a antibióticos no ambiente de produção de pescado, visto que bactérias do conteúdo intestinal e da superfície da pele de peixes refletem a contaminação do sistema de cultivo e podem ser disseminadas durante o processamento e a manipulação dos mesmos.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar a diversidade de resistência a antibióticos em populações bacterianas isoladas de sistemas de cultivo de tilápias, constituídos por tanques de alvenaria ou tanques de terra, com adubação orgânica ou não, sem histórico da utilização de antibióticos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Produção e consumo do pescado

Os peixes constituem a maior parte da proteína animal consumida em vários lugares do mundo, devido à sua abundância e excelente composição nutricional. Além disso, desempenham importante papel na economia de muitos países, principalmente da Europa e da Ásia. A maior parte da produção de organismos aquáticos é proveniente de países em desenvolvimento (Barros et al., 2002; Huss et al., 2000; Martins & Vaz, 2002).

Em 1999, a aquicultura mundial expandiu cerca de 9%, apresentando um valor líquido de US\$40 bilhões. Nesse mesmo período, o crescimento no Brasil foi de 35%, com um valor total em torno de US\$30 milhões, comprometidos, principalmente, com a venda de peixes vivos para o comércio de lazer dos pesque-e-pagues e uma parte para indústria de processamento do pescado. Porém, a aquicultura pode levar ao aumento do consumo de pescado no país nos próximos dez anos, uma vez que a pesca extrativa tem se apresentado abaixo da metade de seu potencial, com tendência à estabilização ou queda (Oetterer, 2002; Roubach et al., 2003).

Assim, segundo dados da FAO, a piscicultura é uma atividade que vem crescendo num ritmo de 30% ao ano no Brasil, sendo esse índice de crescimento superior ao obtido pela grande maioria das atividades rurais tradicionais. O crescimento dessa atividade se deve ao fato de ela apresentar boa lucratividade e rápido retorno financeiro. A produção nacional é caracterizada pelas pequenas propriedades, onde muitos a consideram uma forma de complementação de renda, e pela grande diversidade de espécies cultivadas, apresentando número superior a 64 (Ostrensky & Boeger, 1998; Roubach et al., 2003).

As espécies exóticas ainda predominam na piscicultura brasileira, como, por exemplo, a tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*; Linnaeus, 1758), introduzida no Brasil em 1971. A produção de tilápias em cultivos semi-intensivos e intensivos é estimada entre 40 e 50 mil toneladas anuais, o que constitui cerca de metade da produção nacional de pescado cultivado. O potencial piscícola da tilápia para pequenos produtores se deve às características da espécie, como rusticidade, resistência ao manuseio e ao transporte, facilidade de arraçoamento, crescimento rápido, hábito alimentar onívoro, resistência a baixas concentrações de oxigênio dissolvido, além de apresentar carne de sabor agradável e com pequenas espinhas (Kubitza, 2003; Otterer, 2002).

Em contraste com a produção, o consumo per capita de pescado in natura no Brasil ainda é muito baixo, em torno de 6 kg/hab/ano. Apenas 10% da população incorporam o pescado em sua alimentação. O hábito de ingerir pescado varia de acordo com a região, oscilando em 21% no norte e nordeste e 2% na região sul. Entretanto, este consumo apresenta potencial de crescimento expressivo. Além disso, a tendência de aumento do consumo de pescados semiprontos, por parte da população, já foi detectada pelos grandes grupos do setor alimentício, que estão processando e distribuindo esses produtos em várias regiões do país (Germano & Germano, 2001; Kubitza, 2003; Rasguido & Albanez, 2000). Os produtos oriundos da aquicultura no Brasil são vendidos diretamente ao consumidor ou comercializados em feiras livres, supermercados, restaurantes, pesque-e-pagues e indústrias de alimentação (Roubach et al., 2003).

Apesar das altas taxas de crescimento da aquicultura brasileira nos últimos anos, o que reflete uma tendência de evolução da exportação dos produtos, ainda falta uma política agressiva de fomento para a promoção da atividade no país. Isso é comprovado pela pequena expressividade da cadeia

produtiva da aqüicultura, principalmente em relação à transformação e à industrialização da produção (Valenti et al., 2000)

2.2 Uso de dejetos de animais na aqüicultura

Entre os diferentes tipos de criação de peixes, o sistema de integração com outros animais tem sido muito utilizado como alternativa para reduzir os custos de produção, pois a combinação de adubos orgânicos e ração permite reduzir a quantidade de ração administrada, mantendo-se a produtividade (Kubitza, 2001). Em 1989, pelo menos dois terços da produção mundial de peixes cultivados originavam-se de tanques fertilizados com adubo orgânico (El-Shafai et al., 2004). Como fertilizante orgânico para pisciculturas, utilizam-se excrementos de aves e de suínos, além de esgoto humano (El-Shafai et al., 2004; Petersen et al., 2002; Petersen & Dalgaard, 2003a).

A prática de aqüicultura integrada tem se tornado comum na Tailândia e outros países do sudeste asiático (Petersen & Dalgaard, 2003b). Nesse sistema, os peixes se alimentam dos dejetos de forma direta, aproveitando os nutrientes não digeridos, ou indireta, já que a ação de bactérias sobre a matéria orgânica, transformando-a em nutrientes inorgânicos, favorece o desenvolvimento do fitoplâncton, base alimentar para o zooplâncton e outros organismos que servem de alimento para os peixes (Cecarelli & Figueira, 2001).

Porém, muitas vezes, a adição de dejetos nos tanques de cultivo é realizada de forma incorreta, sem orientação técnica. Assim, um risco provável da utilização de excrementos animais na piscicultura é a incorporação de microrganismos patogênicos ao homem e a contaminação fecal da microbiota dos viveiros, levando à poluição e ao perigo sanitário (Ostrensky & Boeger, 1998).

Sabe-se que ambientes hídricos equilibrados possuem microbiota própria, que favorece a manutenção da vida de todos os seres e que, apesar dos

avanços tecnológicos em relação à adubação orgânica de viveiros, os dejetos de animais, muitas vezes, contêm diversos patógenos virais, bacterianos, protozoários e helmintos, que podem ser transmitidos ao homem pela água ou por organismos aquáticos, representando um grande risco para a saúde pública. Dentre as bactérias patogênicas que podem ser carregadas pelo adubo orgânico, destacam-se *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Salmonella typhi*, *Shigella spp.* e *Vibrio cholerae* (Cecarelli & Figueira, 2001; Ostrensky & Boeger, 1998).

Por enquanto, não existem estudos epidemiológicos conclusivos associando o uso de dejetos na aquicultura às enfermidades humanas. Mas, na ausência de mecanismos de controle, deve-se utilizar esterco curtido, pasteurizado ou submetido a técnicas de compostagem, biodigestor, dentre outras. As práticas piscícolas de desinfecção e limpeza periódica das instalações utilizadas também devem ser consideradas (Cecarelli & Figueira, 2001; El-Shafai et al., 2004).

Além disso, muitas vezes, antimicrobianos são adicionados à ração de animais de produção para prevenir enfermidades ou promover o crescimento dos mesmos. Assim, o uso de dejetos de suínos e aves na aquicultura pode introduzir resíduos de antibióticos e bactérias resistentes a antibióticos no ambiente de criação dos peixes (Petersen et al., 2002; Petersen & Dalsgaard, 2003a,b). Há relatos de que a prática de pisciculturas integradas pode estar associada com a elevada ocorrência de bactérias resistentes a antibióticos no conteúdo intestinal de peixes, quando comparada à aquicultura tradicional (Petersen et al., 2002; Petersen & Dalsgaard, 2003a). O aumento dos níveis de bactérias resistentes a antibióticos em pisciculturas pode ocorrer apenas transitoriamente, porém, há um grande risco de os genes de resistência a antimicrobianos serem disseminados dentro de uma ampla variedade de bactérias no ambiente aquático (Petersen et al., 2002).

Já está bem determinado o potencial de outros alimentos de origem animal, por exemplo, carne de aves e de suínos, como carreadores de bactérias resistentes a antibióticos para seres humanos por meio do consumo desses produtos (Bogaard & Stobberingh, 2000; Witte, 2000). Entretanto, ainda não foi estabelecido se a presença de bactérias resistentes a antibióticos nos tanques de cultivo em pisciculturas integradas e se a possível presença destas bactérias no conteúdo intestinal dos peixes representam risco para os seres humanos (Petersen et al., 2002).

2.3 Microbiota e contaminação do pescado

O pescado pode veicular uma ampla variedade de microrganismos patogênicos para o homem, sendo a maior parte deles fruto da contaminação ambiental. Outra fonte de contaminação importante é o manejo do pescado, desde o momento da captura até seu destino final, após passar por várias fases de processamento e transporte (Germano et al., 1998).

Dentre os vários microrganismos deterioradores e patogênicos do pescado, as bactérias são consideradas as mais importantes, pois estão naturalmente presentes no ambiente aquático e amplamente distribuídas por toda a superfície corpórea, brânquias e intestino dos peixes (Prata, 1997).

As bactérias mais importantes veiculadas pelo pescado são as do gênero *Vibrio*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* e *Shigella spp.*, comumente encontradas em águas poluídas por esgotos ou dejetos de animais. A manipulação inadequada do pescado pode levar à contaminação por *Streptococcus spp.* e *Staphylococcus aureus*, ambos presentes nas mucosas e na superfície da pele de manipuladores de alimentos, e que encontram no pescado um ambiente favorável à sua multiplicação. Outros agentes bacterianos podem contaminar o pescado, provocando riscos à saúde dos consumidores, como *Escherichia coli*, *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas spp.*, *Aeromonas spp.*,

Enterobacter spp., *Citrobacter spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* tipo C, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus spp.* e outros coliformes fecais. A maioria destes microrganismos está relacionada com a qualidade da água de cultivo e do gelo usado na conservação e ou com os procedimentos pós-captura (Germano et al., 1998; Germano & Germano, 2001; Giannini, 2001; Howgate, 1998; Huss et al., 2000).

Segundo Miettinen et al. (2001), a higiene do processo e do ambiente de processamento é indispensável para a garantia da segurança microbiológica e da boa qualidade dos produtos da indústria de peixes; a higiene da produção é essencial, especialmente para produtos consumidos crus ou semicrus. Além disso, a estocagem incorreta do pescado favorece o crescimento microbiano, que pode atingir níveis elevados.

Em geral, a quantificação e a caracterização de bactérias presentes no pescado refletem vários aspectos, dentre eles condições físico-químicas do ambiente de cultivo (pH, temperatura, oxigênio dissolvido), interações entre microrganismos e peixes, práticas de manejo e coleta dos peixes, manipulação, transporte, armazenamento e os métodos utilizados para o isolamento dos microrganismos (meio de cultura, condições de cultivo) (Ramos & Lyon, 2000).

Os microrganismos que constituem a microbiota gastrointestinal de peixes são influenciados pelas características microbiológicas do ambiente de cultivo. Em função disso, peixes capturados em ambientes poluídos por esgotos e dejetos, em geral, albergam no intestino, nas brânquias e sobre a pele indicadores de poluição fecal e microrganismos potencialmente patogênicos para os seres humanos, que podem ser difundidos durante o abate, a evisceração e o processamento dos mesmos (García-López et al., 2004; Germano & Germano, 2001; Howgate, 1998; Muratori et al., 2000). Embora o cozimento adequado possa inativar estes microrganismos, a contaminação cruzada de outros

alimentos durante a manipulação do pescado representa um risco à saúde de pessoas susceptíveis, como crianças, idosos e adultos imunocomprometidos (González-Rodríguez et al., 2002). Outro ponto a ser considerado é que bactérias resistentes a antibióticos, provenientes do ambiente aquático, podem se adaptar ao organismo humano e transferir genes de resistência a bactérias patogênicas ou da microbiota humana (Bogaard & Stobberingh, 2000; Petersen & Dalsgaard, 2003a).

As bactérias veiculadas pelo pescado podem ser divididas em dois grupos: bactérias naturais do ambiente aquático onde os peixes são criados (bactérias autóctones) e bactérias decorrentes da contaminação do ambiente por dejetos em geral (bactérias alóctones). Um terceiro grupo pode ser considerado e compreende as bactérias introduzidas nos peixes e seus produtos durante a manipulação e o processamento pós-despesca (Howgate, 1998).

Por ser um alimento de fácil decomposição, o pescado exige cuidados especiais, principalmente os relacionados à conservação pelo frio (Germano et al., 1998). Contudo, a maioria dos riscos relacionados ao consumo de peixes e derivados pode ser controlada pela adoção de boas práticas de manufatura, boas práticas de higiene e aplicação do programa de análise dos pontos críticos de controle (Huss et al., 2000).

2.4 Resistência bacteriana a antibióticos

O uso de antibióticos há mais de 50 anos na medicina humana, medicina veterinária e agricultura tem resultado no aumento do número de bactérias comensais e patogênicas resistentes a agentes antimicrobianos. Isso tem se tornado um dos principais problemas de saúde pública, pois está havendo propagação da resistência a antimicrobianos entre bactérias patogênicas, dificultando o tratamento clínico de pacientes (Bogaard & Stobberingh, 2000; Rivera-Tapia, 2003). A resistência antimicrobiana é definida frequentemente

dentro de um contexto clínico e, raramente, como atributo epidemiológico. Assim, uma bactéria é considerada resistente a determinado antibiótico quando é capaz de se multiplicar *in vitro* na presença da concentração plasmática que a droga atinge, de acordo com as recomendações terapêuticas (Davison et al., 2000; Tavares, 1993).

Além disso, o uso de antibióticos para profilaxia, tratamento ou como promotor de crescimento na produção animal e para tratamento de pacientes em hospitais colabora para que resíduos de drogas e bactérias resistentes às mesmas sejam excretados por animais ou seres humanos e, assim, sejam disseminadas pelo ambiente. Bactérias resistentes são encontradas no solo, na água, nos animais, nos peixes, ou seja, em todos os ambientes onde os seres humanos possam ter contato, inclusive nos alimentos e na água de beber. Assim, há necessidade urgente de estabelecerem-se bases para o uso de drogas antimicrobianas e o uso racional deve ser baseado no conhecimento atual dos mecanismos de resistência desenvolvidos pelos microrganismos, da transferência de genes de resistência e dos mecanismos de ação dessas drogas (Ali Abadi & Lees, 2000; Wegener & Moller, 2000).

Na presença de genes de resistência, a seleção de uma subpopulação de microrganismos resistentes pode ser uma consequência da pressão de seleção devido ao uso de antimicrobianos. Esta pressão leva ao desenvolvimento de resistência de forma mais efetiva quando antibióticos são utilizados em doses menores do que o recomendável. O poder de seleção é proporcional ao tempo de exposição das bactérias ao antibiótico e, além disso, o mecanismo de ação das drogas sobre os microrganismos é fundamental para a determinação da resistência (Ali Abadi & Lees, 2000; Butaye et al., 2003).

Embora algumas bactérias sejam naturalmente resistentes a alguns antibióticos (resistência natural), a emergência de resistência antimicrobiana em populações bacterianas anteriormente susceptíveis tem sido associada ao uso de



antibióticos (resistência adquirida) (Davison et al., 2000). Cada mecanismo de resistência adquirida às drogas pode ser originado pela aquisição horizontal de genes, carreada por plasmídeos, transposons ou bacteriófagos, por recombinação de DNA externo ao cromossomo ou pela mutação em diferentes sítios do cromossomo bacteriano. A via mais importante para aquisição de genes de resistência é a transferência de plasmídeos entre bactérias da mesma espécie, filogeneticamente distantes ou com habitats distintos. Isto pode envolver a transferência de resistência a vários antibióticos simultaneamente, contribuindo para o aumento da prevalência de bactérias com múltipla resistência. Por outro lado, a resistência cromossômica pode ser passada apenas para a progênie (dispersão clonal), sendo limitada sua habilidade de disseminação (Ali Abadi & Lees, 2000; Butaye et al., 2003; Davison et al., 2000; Rivera-Tapia, 2003; Smith & Lewin, 1993).

Bactérias possuem mecanismos bem caracterizados pelos quais se tornam resistentes a antibióticos. Dentre esses mecanismos, destaca-se a modificação do sítio alvo da droga ou das enzimas necessárias para ativação da mesma, inativação ou destruição enzimática da droga, redução da permeabilidade celular à droga ou desvio metabólico, efluxo ativo da droga e superprodução da enzima alvo (McKeegan et al., 2002; Smith & Lewin, 1993). Genes que codificam sistemas de efluxo de antibióticos são frequentemente associados a elementos genéticos móveis que podem ser facilmente transferidos entre bactérias. Alguns sistemas de efluxo específicos estão relacionados com resistência a macrolídeos, lincosamidas, tetraciclinas e cloranfenicol em bactérias gram negativas e gram positivas (Butaye et al., 2003).

Durante muitas décadas, o foco sobre a prevalência da disseminação e dos mecanismos envolvidos na resistência bacteriana a antibióticos estava concentrado sobre patógenos. Entretanto, atualmente, tem-se ressaltado a importância do estudo da mobilidade e da transferência de genes de resistência

entre bactérias comensais de animais e de seres humanos ou entre bactérias não patogênicas do ambiente e bactérias com importância médica. Além disso, uma conexão entre o uso de antibióticos na produção animal e o aumento de resistência a antibióticos por patógenos de seres humanos tem sido melhor estudada (Bogaard & Stobberingh, 2000; Rhodes et al., 2000; Sorum & Abée-Lund, 2002).

Há evidências crescentes de que a microbiota representa uma oportunidade para a seleção de genes de resistência, que podem ser disseminados a outras espécies ou gêneros bacterianos por meio de transferência horizontal, como processos de conjugação, transdução e transformação (Rivera-Tapia, 2003; Witte, 2000). Deve-se ressaltar que os patógenos hospitalares e a microbiota comensal de seres humanos e de animais são considerados importantes reservatórios de resistência a antibióticos. Portanto, a necessidade de controlar e de limitar a disseminação de resistência faz aumentar a importância do conhecimento do papel exercido pelos reservatórios no desenvolvimento, na manutenção e na disseminação da resistência às drogas (Rhodes et al., 2000; Smith & Lewin, 1993; Witte, 2000).

Vários genes de resistência a antibióticos foram seqüenciados e, comparando-se as seqüências, elas se mostraram idênticas ou muito semelhantes, mesmo entre genes extraídos de diferentes ambientes. Isto sugere que bactérias relacionadas a alimentos podem adquirir genes de resistência de uma ampla variedade de nichos ecológicos (Sorum & Abée-Lund, 2002). A conjugação e a transferência de plasmídeos R são fenômenos comuns no ambiente e podem ocorrer entre cepas bacterianas de seres humanos, animais e peixes que não são relacionadas evolutivamente, nem ecologicamente, até mesmo na ausência de antibióticos. Conseqüentemente, a contaminação do ambiente com patógenos bacterianos resistentes a agentes antimicrobianos é uma ameaça não só como fonte de doença, mas também como fonte de

plasmídeos R que podem se disseminar facilmente a outros patógenos de diversas origens (Kruse & Sorum, 1994).

Dentre as diversas rotas de comunicação entre reservatórios de resistência a antibióticos em seres humanos e na produção animal, o papel da cadeia alimentar é bem determinado. Estudos recentes revelam que o uso de antibióticos em todas as partes da cadeia de produção de alimentos contribui para o aumento do nível de resistência a antibióticos entre bactérias patogênicas veiculadas por alimentos. Além disso, bactérias relacionadas a alimentos constituem um grupo heterogêneo com habitats originais estendendo-se a todos os nichos onde alimentos para o consumo humano são produzidos ou manipulados (Sorum & Abée-Lund, 2002; Witte, 2000).

2.5 Desenvolvimento de resistência bacteriana a antibióticos na aquicultura

Embora a maioria dos estudos de desenvolvimento de bactérias resistentes tenha foco principalmente em bovinos, aves e suínos, a emergência de amostras resistentes a antibióticos em patógenos de peixes tem sido registrada em sistemas aquícolas tropicais e temperados, visto que muitos compostos antimicrobianos são utilizados para tratamento e profilaxia de enfermidades em pisciculturas (Hatha et al., 2005; McPhearson et al., 1991).

Hölmstrom et al. (2003) relataram que o uso profilático de antibióticos na aquicultura tem se tornado comum, principalmente em países em desenvolvimento como a Tailândia. Os antibióticos mais utilizados pelos produtores na Ásia são norfloxacin, oxitetraciclina, enrofloxacin e sulfonamidas, que também são empregados na terapêutica humana. No Reino Unido, os antibióticos aprovados para uso em pisciculturas são oxitetraciclina, ácido oxolínico, amoxicilina e co-trimazina, porém, é recomendado um período mínimo de retirada da medicação antes do abate (Alderman & Hastings, 1998). No Brasil, apesar de não haver levantamentos sobre o uso de antibióticos na

aqüicultura, as drogas mais utilizadas são oxitetraciclina, sulfa/trimetoprim e ácido oxolínico. Porém, na legislação brasileira, não há regulamento para a utilização de nenhuma droga na aqüicultura.

Segundo Vivekanandham et al. (2002), a resistência de bactérias patogênicas a antibióticos é um problema mais severo nos países em desenvolvimento, onde não há controle do uso de antimicrobianos. Outro ponto a ser ressaltado é que, nesses países, a água de beber nem sempre é tratada. Assim, bactérias resistentes a antibióticos em pisciculturas podem ser carregadas aos seres humanos que bebem diretamente a água oriunda dessas criações de peixes (Alderman & Hastings, 1998).

Outra fonte potencial de transferência de bactérias resistentes e genes de resistência, do ambiente aqüícola para os seres humanos, é o consumo direto desses microrganismos presentes em pescados e derivados crus ou que sofreram cocção inadequada (Petersen et al., 2002; Petersen & Dalsgaard, 2003a). Rhodes et al. (2000) demonstraram que plasmídeos albergando genes de resistência à tetraciclina podem ser transferidos entre diferentes espécies de *Aeromonas* e *Escherichia coli* e entre ambientes hospitalares e aqüícolas em diferentes localizações geográficas. Esses autores consideram que os ambientes hospitalar e piscícola constituem um único ambiente interativo, pois plasmídeos InCUR associados previamente somente à piscicultura foram encontrados em isolados hospitalares. A resistência a antibióticos mediada por plasmídeos também foi identificada em alguns patógenos bacterianos de peixes, como *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Photobacterium damsela subsp. piscicida*, *Edwardsiella tarda* e *Yersinia ruckeri* (Alderman & Hastings, 1998).

Além disso, o uso profilático de antibióticos na aqüicultura afeta a densidade de bactérias no tanque de cultivo, sendo que a frequência de resistência a antimicrobianos reflete o uso dos mesmos durante o cultivo de

camarão. Assim, sugere-se que parte dos antimicrobianos administrados na ração passam pelo intestino dos organismos cultivados sem serem absorvidos e alcançam o ambiente do tanque na sua forma ativa, contribuindo para a seleção de bactérias resistentes na microbiota do tanque e dos organismos cultivados (Tendencia & dela Pena, 2002).

Portanto, o uso de antibióticos na aqüicultura deve ser limitado, a fim de se reduzir a disseminação de resistência aos mesmos em bactérias patogênicas ou da flora comensal de peixes e outros organismos cultivados, além de evitar o risco da presença de resíduos de drogas nos alimentos destinados ao consumo humano. Deve-se enfatizar a importância de se adotar medidas profiláticas na aqüicultura, como a vacinação, assim o uso de antibióticos é necessário apenas quando houver surtos de doenças bacterianas (Bruun et al., 2003).

Porém, poucos estudos têm caracterizado a presença de bactérias resistentes em ambientes aqüícolas sem uso prévio de antibióticos. Percentuais significativos de resistência bacteriana em tanques de cultivo de camarão, nos quais não havia uso de antimicrobianos, foram descritos por Tendencia & dela Pena (2002). Portanto, há necessidade da realização de novos estudos, a fim de se verificar a presença de bactérias resistentes em ambientes aqüícolas sem utilização prévia de antimicrobianos.

Geralmente, o perfil de resistência bacteriana aos antibióticos é mensurado por meio de métodos qualitativos, como o método de discos de difusão descrito por Bauer et al. (1966). Entretanto, poucos trabalhos têm sido conduzidos considerando-se a população total de bactérias isoladas de uma determinada amostra frente à ação de antibióticos. Alguns estudos demonstraram a importância desta outra maneira de se verificar o perfil de resistência a antibióticos em bactérias isoladas dos ambientes de cultivo de pescados, encontrando altos níveis de resistência aos antibióticos em populações isoladas do ambiente e dos animais cultivados (Lima, 2004; Miranda & Zemelman, 2001;

Petersen & Dalsgaard, 2003a; Tendencia & dela Peña, 2002). Essa metodologia adiciona informações mais precisas sobre a difusão da resistência bacteriana na aquicultura e sua inserção na cadeia alimentar humana.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

Realizou-se uma análise quantitativa seguida de análise qualitativa da ocorrência de bactérias resistentes a antibióticos em diferentes sistemas de cultivo de tilápias do Nilo. Para análise quantitativa, mensuraram-se as populações bacterianas oriundas de sistemas de cultivo de tilápias do nilo, com manejos distintos. Para tal, utilizou-se ágar soja tripticaseína (TSA) sem antibióticos ou suplementado, individualmente, com ampicilina, cloranfenicol, norfloxacina ou tetraciclina. O delineamento experimental foi em blocos casualizados disposto em esquema fatorial 7x4, apresentando o total de dois fatores, microambientes (água de abastecimento, água do tanque, ração, adubo orgânico, muco de superfície e conteúdo intestinal) e antibióticos (ampicilina, cloranfenicol, norfloxacina e tetraciclina), e três blocos, sistemas de cultivo denominados 1, 2 e 3.

Na análise qualitativa, as principais famílias bacterianas resistentes aos antibióticos nos ambientes analisados foram determinadas. Posteriormente, o perfil de resistência a antibióticos foi verificado pelo método de difusão em disco, que permitiu a determinação da multirresistência dos isolados identificados às drogas testadas.

3.2 Sistemas de cultivo de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*)

Foram analisados três diferentes sistemas de cultivo de tilápias do nilo, sem utilização prévia de antibióticos, que eram contemporâneos e localizados na mesma propriedade, sendo os mesmos povoados simultaneamente. O sistema 1 era constituído por tanque de alvenaria e, para alimentação dos peixes, utilizava-se ração comercial extrusada para fase de engorda com 28% de proteína. No sistema 2, constituído por tanque de terra escavado, utilizava-se, para alimentação das tilápias, a mesma ração do sistema 1. O arraçoamento nos sistemas 1 e 2 era realizado duas vezes ao dia. O sistema 3 era constituído por tanque de terra escavado com adubação e não havia arraçoamento. A fertilização do sistema 3 foi realizada antes de seu povoamento, por meio da adição de adubo orgânico e inorgânico. Como adubo orgânico, foram utilizados excretas de aves submetidos à compostagem. Uma mistura de sulfato de amônia e superfosfato simples, mantendo-se uma relação nitrogênio:fósforo de 5:1, foi utilizada para adubação inorgânica. Além disso, a manutenção foi realizada por meio da adição quinzenal do adubo orgânico ao tanque de cultivo do sistema 3. A coleta de amostras do sistema 3 ocorreu cerca de 4 meses após sua fertilização inicial.

A água de abastecimento da piscicultura foi proveniente de açude próprio, que represava água de chuva não tratada.

3.3 Amostras coletadas

Para comparar a diversidade de populações bacterianas entre diferentes sistemas de cultivo de tilápias, três sistemas com manejos distintos (tanque de alvenaria com arraçoamento, tanque de terra com arraçoamento e tanque de terra com adubação orgânica) foram amostrados. As coletas foram realizadas em dias diferentes, com intervalo máximo de uma semana entre as mesmas.

3.3.1 Água de abastecimento e do tanque

A água de abastecimento foi coletada em dois pontos, antes de atingir a bifurcação para os diferentes sistemas. Dos sistemas selecionados, foram coletadas amostras de água de três diferentes pontos do tanque de cultivo, cerca de 30 centímetros abaixo da superfície da lâmina d'água. As amostras de água foram coletadas em frascos estéreis e enviadas ao laboratório.

3.3.2 Ração e adubo orgânico

Foram coletados 100 gramas de ração comercial extrusada, nos dias em que o sistema 1 e o sistema 2 foram amostrados. No dia de análise do sistema 3, 100 gramas do adubo orgânico foram coletados. As amostras acondicionadas em frascos estéreis foram encaminhadas ao laboratório para análise microbiológica.

3.3.3 Peixes

De cada sistema selecionado, coletaram-se três tilápias em estágio de pré-abate, com peso médio de 300 gramas, que foram acondicionadas em sacos plásticos dentro de caixas de isopor e transportadas vivas, à temperatura ambiente, ao laboratório. No laboratório, os peixes foram sacrificados por choque térmico, conforme recomendado por Noga (1996) e foram submetidos à metodologia da rinsagem ou lavagem superficial (Harrigan, 1998). Posteriormente, realizou-se a coleta asséptica do conteúdo intestinal dos mesmos.

3.4 Quantificação das populações bacterianas

3.4.1 Meios de cultura e condições de cultivo

Para a quantificação das populações bacterianas de todas as amostras coletadas, foi utilizado o ágar soja tripticaseína (TSA) (Biolife, Itália), suplementado com nistatina (1000UI/mL) (Teuto, Brasil), a fim de reduzir a

contaminação por fungos. As amostras coletadas foram submetidas a diluições seriadas. Alíquotas de 0,1mL das diluições adequadas foram semeadas em duplicata, utilizando-se o método de espalhamento na superfície, em TSA sem antibiótico (controle) e TSA suplementado, separadamente, com ampicilina (10µg/mL), cloranfenicol (25µg/mL), norfloxacina (25µg/mL) e tetraciclina (25µg/mL). As placas semeadas foram incubadas à temperatura de 30°C durante 24 horas. A leitura foi realizada por meio da contagem das colônias e determinação das unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL), considerando-se a média das duplicatas da diluição que apresentou 30 a 300 colônias isoladas por placa. Posteriormente, os resultados obtidos foram convertidos em logaritmo (log) de base 10 para realização da análise estatística.

O percentual de recuperação de bactérias resistentes a antibióticos foi determinado por meio da divisão do número de UFC/mL do meio suplementado com antibióticos pelo número de UFC/mL do meio sem antibióticos. O resultado dessa divisão foi multiplicado por 100 para gerar o percentual de bactérias resistentes.

3.4.2 Água do tanque e de abastecimento

Após homogeneização de cada amostra, alíquotas de 1mL de água foram inoculadas em tubos contendo 9mL de solução salina 0,85% estéril, procedendo-se a diluições seriadas até 10^{-2} .

3.4.3 Ração e adubo orgânico

Dez gramas da ração ou do adubo orgânico foram triturados e homogeneizados em 90mL de solução salina 0,85% estéril. Após a homogeneização, foram realizadas diluições seriadas até 10^{-4} e 10^{-6} , para ração e adubo, respectivamente.

3.4.4 Microbiota da superfície das tilápias

Os peixes transportados até o laboratório foram lavados em solução salina 0,85% estéril dentro de sacos plásticos. A amostragem foi realizada pela metodologia da rinsagem ou lavagem superficial (Harrigan, 1998). O produto da rinsagem foi diluído seriadamente até 10^{-2} .

3.4.5 Conteúdo intestinal

A obtenção asséptica de amostras do conteúdo intestinal de cada peixe foi realizada de acordo com o recomendado por Noga (1996) e pelo Office International des Epizooties (OIE, 2001). Foi realizada a desinfecção da superfície dos peixes com álcool 70% e, posteriormente, uma incisão na porção ventral média, utilizando-se instrumentos cirúrgicos estéreis. Parte do intestino foi seccionada e colocada em placas de Petri estéreis. Um grama do conteúdo intestinal foi diluído e homogeneizado em tubo contendo 9 mL de solução salina 0,85% estéril, procedendo-se a diluições seriadas até 10^{-6} .

3.5 Análise qualitativa

3.5.1 Identificação das principais famílias bacterianas

Após a determinação das populações bacterianas resistentes aos antibióticos testados (ampicilina, cloranfenicol, norfloxacin e tetraciclina), foram selecionadas e repicadas em TSA cinco colônias de diferentes morfotipos da duplicata da melhor diluição de cada amostra. Quando o número de morfotipos diferentes superava cinco por placa, um representante de cada morfotipo era repicado para posterior identificação. Os isolados foram submetidos aos testes de gram, catalase, oxidase e oxidação-fermentação (O-F) para a identificação de quatro famílias distintas: Enterobacteriaceae, Micrococcaceae, Pseudomonadaceae e Vibrionaceae (Quinn et al., 1994).

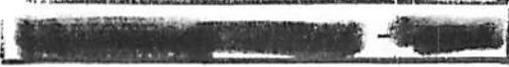
3.5.2 Perfil de resistência a antibióticos

Representantes das famílias bacterianas identificadas foram submetidos à determinação do perfil qualitativo de resistência a antibióticos, pelo método de difusão de discos de antibióticos, utilizando-se ágar Mueller Hinton (Oxoid, USA) (NCCLS, 1990). Os antibióticos selecionados para a realização dos testes representam diferentes classes de drogas, além de serem relevantes para terapêutica na medicina humana e veterinária, são eles: ampicilina, cefuroxima, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, nitrofurantoína, norfloxacina, tetraciclina e sulfonamidas. Foram utilizadas, como controle de qualidade do teste, as amostras de referência *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Amostras das famílias identificadas foram repicadas em TSA, de onde foi coletada uma porção de massa bacteriana que foi diluída e homogeneizada em solução salina 0,85% estéril, sendo a turbidez da suspensão comparada à do padrão 0,5 da escala de McFarland, que equivale aproximadamente a 10^8 UFC/mL. Por meio de “swabs” estéreis embebidos na suspensão bacteriana, a amostra foi estriada em placas de petri contendo ágar Mueller Hinton. Os discos de antibióticos (CECON, Brasil) foram colocados na superfície do ágar, utilizando-se pinças previamente flambadas. As placas foram incubadas em estufa a 30°C durante 18-24 horas. Após a incubação, os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados e comparados com a tabela de performance padrão para testes de susceptibilidade a antibióticos e, então, as bactérias foram classificadas como sensíveis ou resistentes.

3.5.3 Perfil de múltipla resistência a antibióticos

O índice MAR (*multiple antibiotic resistance*) foi utilizado para determinação da multirresistência. Este índice, quando aplicado a um isolado, é definido como a/b , ou seja, divide-se o número de antibióticos aos quais o



isolado foi resistente (a) pelo número de antibióticos aos quais o isolado foi exposto (b). Índice MAR acima de 0,2 indica multirresistência (Krumperman, 1983).

3.6 Análise estatística

Inicialmente foram gerados gráficos de caixa (box-plot) descritivos para cada fator, permitindo rápida comparação que orientou a escolha dos testes de hipótese.

Para comparar as populações bacterianas resistentes aos antibióticos testados nos diferentes microambientes dos sistemas de cultivo analisados, foi usada a análise de variância (ANAVA) do modelo $\log y_{ijkl} = \mu + s_{(i)} + m_{(j)} + a_{(k)} + (m \times a)_{jk} + e_{ijkl}$, sendo s_i : sistemas de cultivo com $i = 1 \dots 3$, m_j : microambientes com $j = 1 \dots 6$ e a_k : antibióticos com $k = 1 \dots 4$. O experimento foi montado em blocos casualizados num esquema fatorial, assumindo que $e_{ijkl} \sim n(0, \delta^2)$, adotando-se o nível de 5% de significância para a realização dos testes F da ANAVA.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Populações bacterianas resistentes isoladas dos diferentes sistemas de cultivo analisados

Os dados da Tabela 1 representam as populações bacterianas totais e resistentes a antibióticos isoladas da água de abastecimento dos diferentes sistemas de cultivo de tilápias. Nos dias das coletas 1, 2 e 3, foram coletadas as demais amostras para análise dos sistemas de cultivo 1, 2 e 3, respectivamente. Foi observado que, no sistema 1, houve isolamento de um maior número de bactérias totais e resistentes a todos os antibióticos testados na água de abastecimento, se comparado aos outros sistemas. A água de abastecimento, apesar de ser a mesma para os três sistemas, foi coletada em dias diferentes e apresentou populações bacterianas resistentes à ampicilina, ao cloranfenicol e à norfloxacina em todas as coletas.

TABELA 1 Quadro de resumo das populações bacterianas resistentes a antibióticos para a água de abastecimento de sistemas de cultivo de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) em três coletas, realizadas em dias distintos

Amostra	Coleta	Controle	Ampicilina	Cloranfenicol	Norfloxacina	Tetraciclina
Água de Abastecimento	1	5.50×10^3	1.61×10^3	5.00×10^3	1.54×10^3	4.46×10^3
	2	9.55×10^2	1.82×10^2	3.63×10^2	4.26×10^2	0,00
	3	5.49×10^2	1.86×10^2	3.80×10^2	1.54×10^2	0,00

Na Tabela 2, estão representadas as médias de populações bacterianas totais e resistentes a antibióticos isoladas de cada amostra analisada, dos diferentes sistemas de cultivo de tilápias. No sistema 1 não foram isoladas bactérias resistentes à norfloxacinina e à tetraciclina na água do tanque e no muco de superfície, porém, no conteúdo intestinal, isolaram-se bactérias resistentes à tetraciclina. O sistema 2 apresentou população bacteriana resistente à tetraciclina na água do tanque, porém, não houve isolamento de bactérias resistentes à norfloxacinina na água do tanque, no muco de superfície e no conteúdo intestinal. Esses dados sugerem que as bactérias resistentes à norfloxacinina presentes na água de abastecimento não se adaptam ao ambiente de cultivo dos peixes nos sistemas 1 e 2. A ração apresentou contagem bacteriana mais baixa no sistema 2, se comparada ao sistema 1, visto que, apesar de ser a mesma ração comercial, a coleta foi realizada em dias distintos.

Em relação ao sistema 3, houve o isolamento de bactérias resistentes à norfloxacinina na água do tanque e no muco de superfície, porém, essa população bacteriana foi ausente no conteúdo intestinal. Além disso, populações bacterianas resistentes à tetraciclina estiveram presentes no muco de superfície e no conteúdo intestinal dos peixes coletados do sistema 3. O adubo orgânico apresentou elevada população bacteriana total e resistente a todos os antibióticos testados, visto que o mesmo era constituído por excretas de aves submetidos à compostagem, o que não elimina os microrganismos presentes no mesmo.

TABELA 2 Quadro de resumo das médias das populações bacterianas resistentes a antibióticos para as amostras coletadas dos sistemas de cultivo 1, 2 e 3 de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Amostra	Tratamento*	Controle	Ampicilina	Cloranfenicol	Norfloxacina	Tetraciclina
Água do tanque	Sistema 1	$3,16 \times 10^2$	$2,29 \times 10^2$	$3,71 \times 10^2$	0,00	0,00
	Sistema 2	$8,31 \times 10^2$	$6,60 \times 10^2$	$5,37 \times 10^2$	0,00	$1,28 \times 10^1$
	Sistema 3	$7,24 \times 10^2$	$3,55 \times 10^2$	$1,02 \times 10^3$	$3,54 \times 10^2$	0,00
Ração ou Adubo orgânico	Sistema 1	$6,45 \times 10^2$	0,00	$5,01 \times 10^2$	0,00	0,00
	Sistema 2	$< 1,0 \times 10^1$	0,00	0,00	0,00	0,00
	Sistema 3	$8,31 \times 10^9$	$1,66 \times 10^9$	$3,71 \times 10^9$	$4,46 \times 10^6$	$3,63 \times 10^7$
Muco de superfície	Sistema 1	$1,62 \times 10^3$	$1,04 \times 10^3$	$7,41 \times 10^2$	0,00	0,00
	Sistema 2	$6,45 \times 10^2$	$3,63 \times 10^2$	$4,57 \times 10^2$	0,00	0,00
	Sistema 3	$3,71 \times 10^3$	$9,33 \times 10^2$	$1,44 \times 10^3$	$3,98 \times 10^2$	$1,90 \times 10^2$
Conteúdo Intestinal	Sistema 1	$1,55 \times 10^7$	$5,49 \times 10^6$	$4,89 \times 10^5$	0,00	$1,34 \times 10^5$
	Sistema 2	$1,82 \times 10^6$	$3,31 \times 10^5$	$2,04 \times 10^5$	0,00	0,00
	Sistema 3	$8,31 \times 10^7$	$2,23 \times 10^7$	$5,01 \times 10^6$	0,00	$2,57 \times 10^5$

* Sistema 1- tanque de alvenaria com arraçoamento; Sistema 2- tanque de terra com arraçoamento; Sistema 3- tanque de terra com adubação orgânica

Apesar de não haver a utilização prévia de antibióticos nos sistemas analisados, ocorreu o isolamento de populações bacterianas resistentes a ampicilina, cloranfenicol, norfloxacina e tetraciclina. Isso representa a disseminação e a expressão de genes de resistência a antibióticos no ambiente aquícola estudado, mesmo na ausência de drogas.

Neste trabalho, isolaram-se todas as populações bacterianas viáveis presentes nos sistemas de cultivo de tilápias analisados, determinando-se a resistência global das mesmas a diferentes antibióticos. Muitos trabalhos sobre resistência a antibióticos no ambiente aquítico consideram apenas bactérias patogênicas como indicadores de poluição, relacionando-as a doenças infecciosas e genes de resistência. Porém, é mais válido mensurar todas as populações bacterianas presentes no ambiente aquítico, visto que as mesmas podem albergar determinantes de resistência a antibióticos que podem ser

transferidos a patógenos de seres humanos e de animais (Goni-Urriza et al., 2000).

Para o isolamento das bactérias de interesse, utilizou-se TSA suplementado com ampicilina, norfloxacin e tetraciclina, antibióticos freqüentemente utilizados na terapêutica de seres humanos e de animais, e TSA suplementado com cloranfenicol. Apesar da proibição do uso de cloranfenicol na produção animal na maioria dos países ter ocorrido em torno de 1990, o interesse em verificar populações resistentes a essa droga nos sistemas de criação analisados advém do fato de genes de resistência ao cloranfenicol serem identificados em elementos genéticos móveis e em locus de multirresistência no genoma bacteriano (Arcangioli et al., 1999). Além disso, recentemente, foi identificada a ocorrência de resistência a esse antibiótico em bactérias patogênicas de peixes (Michel et al., 2003).

O gráfico da Figura 1 representa o total de populações bacterianas presentes em cada sistema de cultivo analisado. Observa-se que o número total de populações bacterianas diferiu entre os sistemas de cultivo de tilápias. O sistema 2 (tanque de terra + ração) apresentou contagem bacteriana total mais baixa em relação ao sistema 1 (tanque de alvenaria + ração) ($P < 0,01$). Porém, o sistema 3 (tanque de terra + adubo orgânico) apresentou maior número de bactérias do que os sistemas 1 e 2, resultado muito próximo do limite de significância ($P = 0,0507$). Esperava-se que o tanque de terra levasse à maior contaminação do ambiente de cultivo do pescado, visto que o solo é rico em microrganismos. Porém, observou-se que o tanque de terra com arraçoamento apresentou menor número de populações bacterianas, quando comparado ao tanque de alvenaria. Além disso, os resultados sugerem que o adubo orgânico seja o fator determinante para o aumento do número de bactérias presentes no sistema 3.

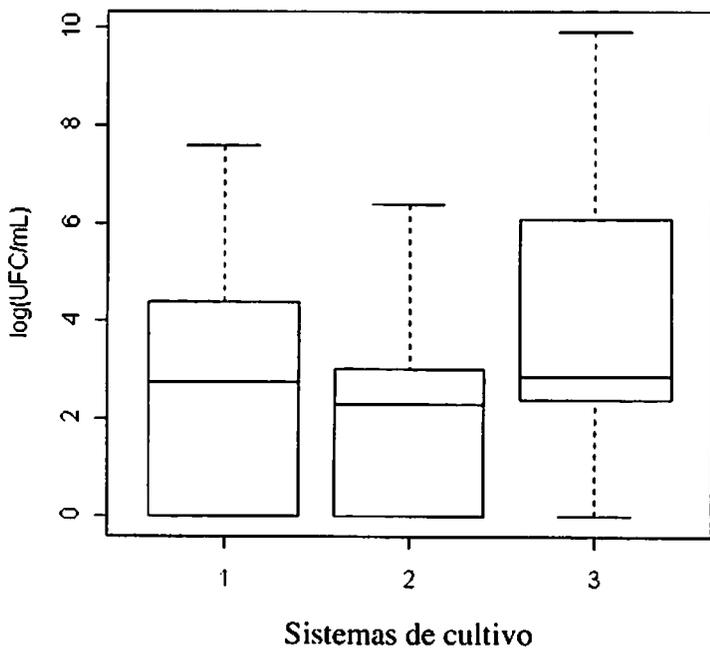


FIGURA 1 Gráfico de caixa representando o total de populações bacterianas nos diferentes sistemas de cultivo de tilápias do Nilo (Sistema 1- tanque de alvenaria com arraçoamento; Sistema 2- tanque de terra com arraçoamento; Sistema 3- tanque de terra com adubação orgânica)

O total de populações bacterianas resistentes aos antibióticos testados, presentes nos sistemas de cultivo, está representado em conjunto na Figura 2, na qual pode-se observar que a contagem de bactérias resistentes à norfloxacina foi inferior à dos demais antibióticos ($P < 0,05$). As populações bacterianas resistentes à ampicilina e ao cloranfenicol foram semelhantes entre si e ao controle. Em relação à tetraciclina, houve menor número de bactérias resistentes, se comparado ao controle, porém, este resultado não foi significativo estatisticamente. De modo geral, a contagem de populações bacterianas resistentes aos antibióticos testados foi semelhante nos três sistemas analisados. Resultados semelhantes foram obtidos por Lima (2004), que quantificou populações bacterianas resistentes, isoladas de um sistema de criação constituído por tanque de terra com arraçoamento e observou menor resistência à norfloxacina, quando comparadas ao controle, à ampicilina, à tetraciclina e ao cloranfenicol.

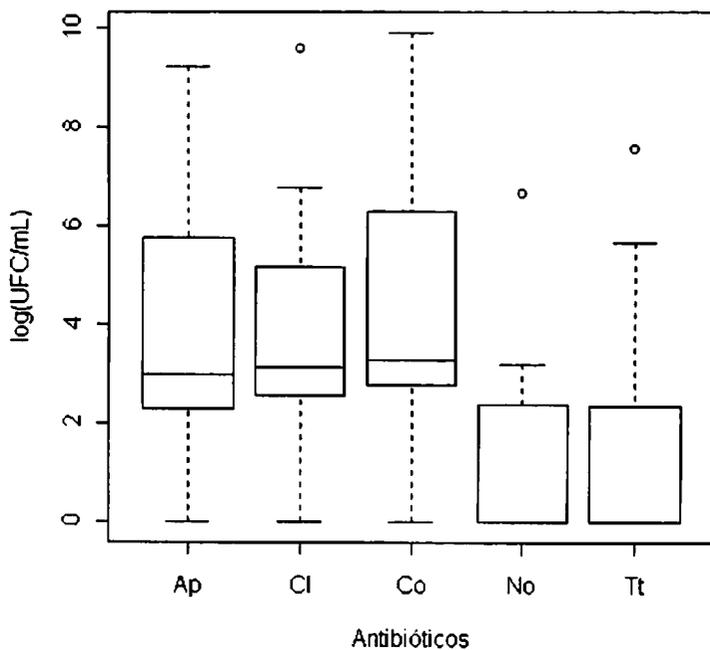


FIGURA 2 Gráfico de caixa representando o total de populações bacterianas resistentes aos diferentes antibióticos testados (Ap- ampicilina, Cl- cloranfenicol, Co- controle, No- norfloxacina e Tt- tetraciclina)

O gráfico da Figura 3 representa o total de bactérias isoladas das amostras coletadas dos diferentes sistemas de cultivo de tilápias analisados. O número total de bactérias isoladas foi diferente para cada amostra coletada, como pode ser visualizado na Figura 3. O adubo apresentou número significativamente superior de bactérias em relação às demais amostras, como conteúdo intestinal ($P < 0,05$), água de abastecimento ($P < 0,001$), muco de superfície ($P < 0,001$), ração ($P < 0,001$) e água de cultivo ($P < 0,001$). Assim, a população bacteriana isolada foi superior para o adubo orgânico, seguido pelo conteúdo intestinal dos peixes. Já a água de abastecimento, o muco de superfície e a água do tanque apresentaram médias inferiores, se comparados ao adubo e ao conteúdo intestinal, e não diferiram entre si. Porém, a ração apresentou a menor contagem de bactérias, em relação às demais amostras analisadas.

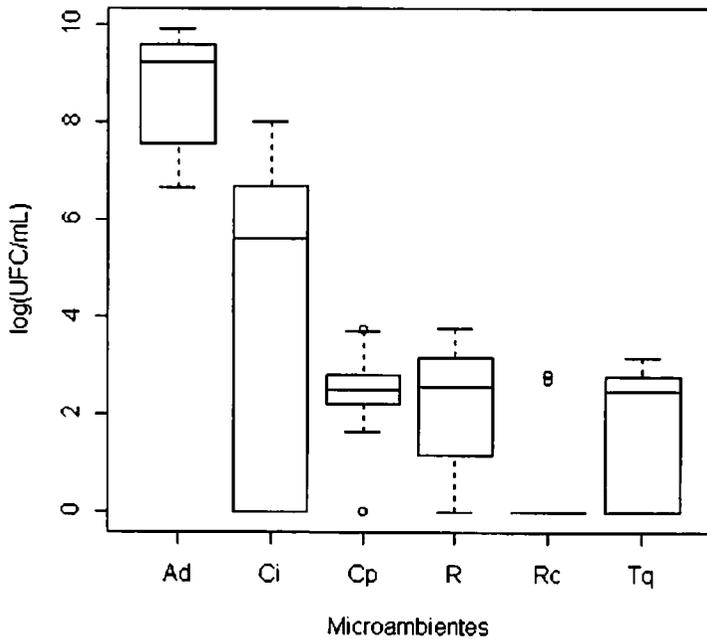


FIGURA 3 Gráfico de caixa representando o total de populações bacterianas isoladas das diferentes amostras coletadas (Ad- adubo; Ci- conteúdo intestinal; Cp- água de abastecimento; R- muco de superfície; Rc- ração; Tq- água do tanque)

As interações entre as diferentes amostras coletadas e os antibióticos testados estão representadas na Figura 4. Conforme está representado, o adubo orgânico apresentou um elevado número de populações bacterianas totais e resistentes a todos os antibióticos testados. O conteúdo intestinal também apresentou grande número de populações bacterianas totais e resistentes à ampicilina, ao cloranfenicol e à tetraciclina; porém, não foram isoladas bactérias resistentes à norfloxacina do conteúdo intestinal ($P < 0,01$), o que sugere que bactérias resistentes à norfloxacina não se adaptam bem a este nicho. A ração apresentou baixa contagem de bactérias totais e resistentes apenas ao cloranfenicol. DePaola et al. (1995), analisando o efeito de ração medicada com oxitetraciclina sobre a densidade de bactérias gram negativas e a prevalência de resistência à tetraciclina, observaram que a frequência de populações bacterianas resistentes no conteúdo intestinal dos peixes cultivados é semelhante à observada na água de cultivo. Porém, neste estudo, a água de abastecimento, a água do tanque e o muco de superfície apresentaram números de populações bacterianas totais e resistentes à ampicilina, ao cloranfenicol e à tetraciclina inferiores às isoladas de adubo orgânico e de conteúdo intestinal. Além disso, Lima (2004) não isolou bactérias resistentes à norfloxacina do conteúdo intestinal de tilápias cultivadas em um tanque de terra, sem utilização prévia de antibióticos, o que corresponde ao observado neste trabalho.

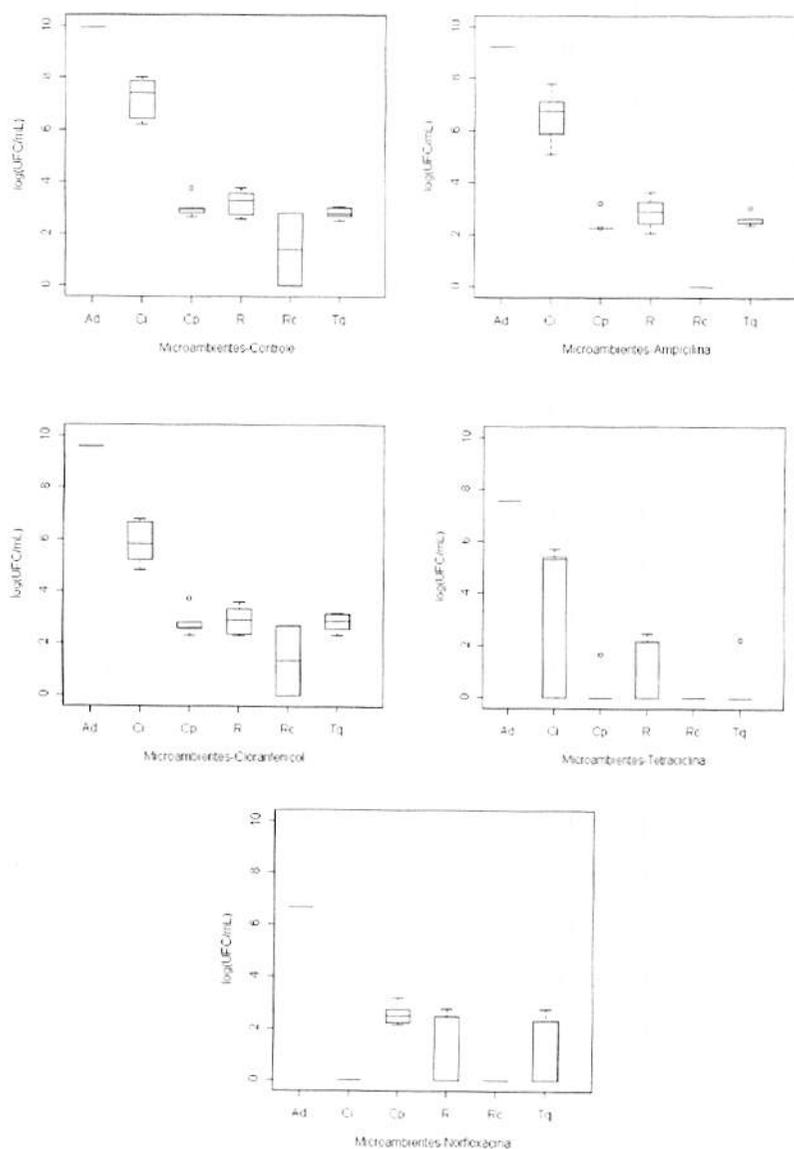


FIGURA 4 Gráficos de caixa representando as populações bacterianas totais (controle) e resistentes aos antibióticos testados (ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina, norfloxacina), em cada amostra coletada, em conjunto, dos três sistemas de cultivo de tilápias do Nilo analisados (Ad- adubo; Ci- conteúdo intestinal; Cp- água de abastecimento; R-muco de superfície; Rc- ração; Tq- água do tanque)

Os dados das Tabelas 3, 4 e 5 representam a porcentagem de recuperação de bactérias resistentes a ampicilina, cloranfenicol, norfloxacina e tetraciclina nos diferentes sistemas de cultivo de tilápias analisados. Os percentuais de recuperação de bactérias resistentes obtidos nos diferentes sistemas analisados foram considerados elevados para ambientes sem utilização prévia de antibióticos, o que também foi demonstrado por Lima (2004). Percentuais inferiores aos relatados neste trabalho foram encontrados em criações de peixes e de camarão onde havia uso constante de drogas (Miranda & Zemelman, 2002b; Tendencia & dela Pena, 2002). As diferentes condições experimentais dos trabalhos podem ter influenciado neste resultado (temperatura, espécie de peixe, local do experimento). Poucos trabalhos têm mensurado o percentual de recuperação de bactérias resistentes a antibióticos em pisciculturas de clima tropical, mas já foi relatado que temperaturas elevadas favorecem o desenvolvimento de determinadas populações bacterianas (Viégas & Souza, 2004).

Este trabalho demonstra que, além de favorecer o desenvolvimento de um maior número de populações bacterianas, altas temperaturas estão associadas à maior recuperação de bactérias resistentes a antibióticos no ambiente aquático. Portanto, sugere-se que densidades populacionais elevadas podem favorecer a disseminação de genes de resistência a antibióticos entre bactérias presentes nos sistemas de cultivo analisados.

TABELA 3 Contagem bacteriana total sobre meio TSA não suplementado com antibióticos (UFC/mL) e porcentagem de recuperação de bactérias resistentes a ampicilina (AMP), norfloxacina (NOR), cloranfenicol (CLO) e tetraciclina (TET) no sistema 1 (tanque de alvenaria com arraçoamento)

Amostras	UFC/mL	Antibióticos (%)			
		AMP	NOR	CLO	TET
Água de abastecimento	5,49 x 10 ³	85%	85%	98%	44%
Água do tanque	3,16 x 10 ²	94%	0%	103%	0%
Ração	1,03 x 10 ²	0%	0%	96%	0%
Muco de superfície	1,62 x 10 ³	93%	11%	92%	0%
Conteúdo intestinal	1,58 x 10 ⁷	97%	0%	79%	71%

TABELA 4 Contagem bacteriana total sobre meio TSA não suplementado com antibióticos (UFC/mL) e porcentagem de recuperação de bactérias resistentes a ampicilina (AMP), norfloxacina (NOR), cloranfenicol (CLO) e tetraciclina (TET) no sistema 2 (tanque de terra com arraçoamento)

Amostras	UFC/mL	Antibióticos (%)			
		AMP	NOR	CLO	TET
Água de abastecimento	9,54 x 10 ²	76%	88%	86%	0%
Água do tanque	8,31 x 10 ²	96%	0%	94%	40%
Ração	< 1,00	-	-	-	-
Muco de superfície	6,60 x 10 ²	90%	0%	94%	0%
Conteúdo intestinal	1,82 x 10 ⁶	88%	0%	85%	0%

TABELA 5 Contagem bacteriana total sobre meio TSA não suplementado com antibióticos (UFC/mL) e porcentagem de recuperação de bactérias resistentes a ampicilina (AMP), norfloxacina (NOR), cloranfenicol (CLO) e tetraciclina (TET) no sistema 3 (tanque de terra com adubação orgânica)

Amostras	UFC/mL	Antibióticos (%)			
		AMP	NOR	CLO	TET
Água de abastecimento	5.37 x 10 ²	83%	81%	95%	0%
Água do tanque	7.24 x 10 ²	90%	89%	106%	0%
Adubo	8.31 x 10 ⁹	93%	67%	96%	76%
Muco de superfície	3.71 x 10 ³	83%	73%	88%	64%
Conteúdo intestinal	8.31 x 10 ⁷	93%	0%	85%	69%

Observou-se, de modo geral, que, apesar da água de abastecimento ter uma baixa contagem bacteriana total, ela apresentou elevados percentuais de recuperação de bactérias resistentes a norfloxacina e ao cloranfenicol. Ao contrário, o conteúdo intestinal apresentou alta contagem bacteriana total, porém, os percentuais de recuperação de resistência para norfloxacina e cloranfenicol foram inferiores aos da água de abastecimento. Esses dados sugerem que outros fatores, além da população bacteriana total, favorecem a porcentagem de bactérias resistentes. Assim, apesar do número de populações bacterianas ser baixo na água de abastecimento, bactérias potencialmente resistentes a cloranfenicol e norfloxacina podem se adaptar ao ambiente de cultivo do pescado, contribuindo para manutenção e disseminação de genes de resistência no mesmo.

Dentre as diferentes amostras analisadas, os menores percentuais de recuperação foram obtidos para a ração, que apresentou bactérias resistentes

apenas ao cloranfenicol no sistema 1. Ao contrário deste trabalho, Lima (2004) isolou elevado número de bactérias resistentes a ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina e norfloxacinina da ração farelada utilizada para alimentação de tilápias. Além disso, populações bacterianas resistentes à oxitetraciclina foram isoladas de rações comerciais peletizadas utilizadas para alimentação de salmão em diferentes sistemas de cultivo no Chile (Miranda & Zemelman, 2002b). Acredita-se que essas diferenças de contaminação da ração por bactérias resistentes a antibióticos sejam decorrentes da sua composição, da qualidade dos seus ingredientes, do seu teor de proteína animal, da temperatura e do local de armazenamento, dentre outros fatores.

Já o adubo orgânico apresentou a maior contagem bacteriana total e elevados percentuais de recuperação de bactérias resistentes a todos os antibióticos testados, sugerindo que o mesmo pode ser uma fonte potencial de contaminação para o sistema 3. Assim, os percentuais de recuperação mais elevados no sistema 3, quando comparado aos sistemas 1 e 2, podem ser decorrentes da utilização do adubo orgânico. Há relatos de que níveis de resistência e de multirresistência são mais elevados em bactérias isoladas em pisciculturas integradas, quando comparadas com sistemas de cultivo tradicionais (Petersen et al., 2002; Petersen & Dalsgaard, 2003a). Segundo El-Shafai et al. (2004), tilápias cultivadas em tanques contaminados por matéria fecal apresentaram brânquias, muco de superfície e fígado contaminados por coliformes fecais, o que pode levar à contaminação dos músculos dos peixes durante a manipulação e preparo do alimento. Além disso, a descarga de dejetos em rios também contribuiu para o aumento de cepas bacterianas alóctones (*Enterobacteriaceae*) e autóctones (*Aeromonas spp.*) resistentes a antibióticos (Goni-Urriza et al., 2000).

Além disso, no sistema 3, houve elevada recuperação de bactérias resistentes à tetraciclina no adubo, no muco de superfície e no conteúdo

intestinal dos peixes. A resistência à tetraciclina tem sido relacionada a elementos genéticos móveis (Speer et al., 1992; Sorum & Abée Lund, 2002). Portanto, o sistema 3 pode ser considerado um reservatório de bactérias que albergam genes de resistência à tetraciclina que podem ser transferidos a bactérias patogênicas ou da microbiota de seres humanos (Rhodes et al., 2000).

Muitos autores associam a presença de bactérias resistentes no ambiente aquático com a utilização de antibióticos no mesmo (Brunn et al., 2003; DePaola et al., 1995; Petersen & Dalsgaard, 2003; Tendencia & dela Peña, 2002; Vivekanandhan et al., 2002). Além disso, o uso de antibióticos na aquicultura altera a densidade de populações bacterianas que constituem a microbiota do ambiente de cultivo (Miranda & Zemelman, 2002b). Entretanto, neste trabalho, verificou-se a recuperação de populações bacterianas resistentes, mesmo em ambientes sem o uso prévio de drogas, o que sugere que outros fatores relacionados à piscicultura, além do uso de antibióticos, tais como água de abastecimento, adubação orgânica e qualidade da água do tanque, favorecem o desenvolvimento de bactérias resistentes.

Portanto, fatores responsáveis pela ocorrência de resistência a antibióticos na ausência da utilização dos mesmos ainda são obscuros. Alguns pesquisadores relatam que níveis elevados de nutrientes podem favorecer o aumento da frequência de bactérias resistentes no ambiente aquático na ausência de antibióticos. A própria água de abastecimento dos sistemas de cultivo pode carrear bactérias que albergam genes de resistência a antibióticos. Esses genes de resistência, quando necessários, podem ser mantidos dentro de uma população, protegendo bactérias de substâncias antimicrobianas produzidas por outros membros da microbiota ou de resíduos agrícolas e de efluentes domésticos (Miranda & Zemelman, 2002b).

4.2 Frequência de famílias bacterianas nos diferentes sistemas analisados

Os dados da Tabela 6 representam o número de representantes das famílias bacterianas presentes nos sistemas de cultivo analisados. Neste trabalho, foram consideradas apenas as famílias bacterianas potencialmente patogênicas para seres humanos e relevantes no que diz respeito ao abrigo e troca de genes de resistência a antibióticos. Verificou-se que grande parte dos isolados bacterianos não se enquadraram em nenhuma das famílias descritas, visto que o ambiente aquático possui grande diversidade de espécies bacterianas (Miranda & Zemelman, 2002b).

TABELA 6 Número de famílias bacterianas isoladas dos diferentes sistemas de cultivo de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Famílias	Sistemas de criação*			Total
	Sistema 1	Sistema 2	Sistema 3	
Enterobacteriaceae	16 (10%)	25 (15%)	4 (2,0%)	45
Micrococcaceae	13 (8,0%)	18 (10%)	56 (23%)	87
Pseudomonadaceae	18 (12%)	27 (16%)	20 (9,0%)	65
Vibrionaceae	32 (20%)	25 (15%)	58 (23%)	115
Não identificadas	80 (50%)	78 (44%)	103 (43%)	261
Total	159	173	241	573

* Sistema 1- tanque de alvenaria com arraçoamento; Sistema 2- tanque de terra com arraçoamento; Sistema 3- tanque de terra com adubação orgânica

No sistema 1, observou-se maior isolamento de membros da família Vibrionaceae. Porém, as famílias Pseudomonadaceae, Vibrionaceae e Enterobacteriaceae predominaram no sistema 2. Já no sistema 3, apesar da adubação orgânica, houve menor isolamento de membros da família Enterobacteriaceae, com predomínio de bactérias das famílias Vibrionaceae e Micrococcaceae. Todos os membros da família Micrococcaceae isolados neste trabalho pertenciam ao gênero *Staphylococcus sp.* De modo geral, a família mais prevalente nos sistemas de criação analisados foi a Vibrionaceae, que é considerada parte da microbiota de ambientes aquáticos.

Miranda & Zemelman (2001) observaram uma maior proporção de bactérias das famílias Enterobacteriaceae e Vibrionaceae em amostras de brânquias e conteúdo intestinal de peixes marinhos capturados no Chile. Representantes da família Micrococcaceae não são comuns no ambiente aquático, porém, este estudo não pôde determinar os fatores que contribuíram para o desenvolvimento destas bactérias nos sistemas analisados, principalmente no sistema 3. Os dados sugerem que o adubo pode ter carreado resíduos de antibióticos ou determinadas populações de bactérias que influenciaram a diversidade de espécies bacterianas no sistema 3. Segundo Petersen & Dalsgaard (2003b), a adubação orgânica em ambientes de cultivo de peixes promove a modificação da microbiota ambiental, alterando o perfil de resistência das populações bacterianas às drogas e a composição das espécies de microrganismos no ambiente.

As famílias identificadas são consideradas da microbiota indígena e não indígena dos peixes. Populações bacterianas semelhantes, como *Staphylococcus sp.* e membros da família Vibrionaceae, foram observadas por Boari (2004) e Lima (2004) em sistema de cultivo de tilápia, constituído por tanque de terra, sem utilização de antibióticos. Embora bactérias possam estar presentes em baixas contagens iniciais no pescado, algumas condições de processamento e de

armazenamento podem levar ao desenvolvimento da população bacteriana, o que constitui um risco para a saúde pública (Huss, 1994).

4.3 Perfil de resistência a antibióticos

Os percentuais de bactérias resistentes, isoladas dos sistemas de cultivo 1, 2 e 3, aos antibióticos testados pelo método de discos de difusão são apresentados na Tabela 7. Observa-se que os perfis de resistência dos isolados bacterianos entre os sistemas de cultivo analisados foram semelhantes. As bactérias apresentaram freqüências de resistência isoladas consideradas elevadas, apresentando-se resistentes, principalmente à ampicilina (β -lactâmico) e à eritromicina (macrolídeo). Menores porcentagens de resistência foram verificadas para norfloxacinina (quinolona) e gentamicina (aminoglicosídeo).

A resistência mediada por elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons conjugativos, é muito comum para β -lactâmicos, macrolídeos e aminoglicosídeos (Radu et al., 2003; Schmidt et al., 2001; Son et al., 1997; Sorum & Abée-Lund, 2002; Takeuchi et al., 2005; Zhao et al., 2003). Assim, a possibilidade de transferência de genes bacterianos de resistência à ampicilina, à eritromicina e à gentamicina nos sistemas de cultivo analisados é real, o que constitui um risco à saúde pública. Além disso, a alta densidade de populações bacterianas nos sistemas de cultivo analisados pode favorecer a troca de genes que codificam mecanismos de resistência a esses antibióticos entre membros da microbiota e bactérias patogênicas. Já a resistência às quinolonas é decorrente de mutações cromossômicas, sendo rara a transferência de resistência, pois a mesma é disseminada por meio da difusão clonal de amostras mutantes (Hawkey, 2003; Zhao et al., 2003). Portanto, a presença de bactérias resistentes à norfloxacinina nos sistemas de criação analisados sugere que, caso haja a utilização de quinolonas nos ambientes estudados, pode haver a seleção clonal de bactérias resistentes a este antibiótico.

TABELA 7 Frequências de resistência a antibióticos em isolados bacterianos, oriundos de diferentes sistemas de cultivo de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Antibióticos	Número de amostras resistentes (%)		
	Sistema 1 ^{a*}	Sistema 2 ^{b*}	Sistema 3 ^{c*}
Ampicilina	23 (72%)	24 (73%)	22 (67%)
Cefuroxima	09 (28%)	17 (51%)	15 (45%)
Cloranfenicol	07 (22%)	10 (30%)	09 (27%)
Eritromicina	26 (81%)	25 (78%)	28 (85%)
Gentamicina	02 (6%)	02 (6%)	05 (15%)
Nitrofurantoína	09 (28%)	13 (39%)	12 (36%)
Norfloxacina	08 (25%)	02 (6%)	06 (18%)
Sulfonamidas	18 (56%)	13 (39%)	12 (36%)
Tetraciclina	18 (56%)	16 (49%)	16 (48%)

a- tanque de alvenaria com arraçoamento; b- tanque de terra com arraçoamento; c- tanque de terra com adubação orgânica

* Número total de isolados bacterianos: 32 (sistema 1), 33 (sistema 2) e 33 (sistema 3)

Os resultados sugerem que os três sistemas de cultivo constituem fontes potenciais de bactérias resistentes, principalmente à eritromicina e à ampicilina, mesmo sem a utilização destas drogas nos mesmos. Entretanto, este trabalho não determinou se os elementos genéticos que caracterizaram resistência aos antibióticos testados são de origem cromossômica ou plasmidial. Caso exista a presença de elementos genéticos móveis nos sistemas de cultivo analisados, estes podem disseminar resistência a antibióticos entre espécies bacterianas presentes no ambiente aquático, filogeneticamente distintas, patogênicas ou não.

Os dados sobre resistência aos antibióticos testados, de acordo com as famílias identificadas nos diferentes sistemas de cultivo, são apresentados na Tabela 8. Dentre as famílias analisadas, verifica-se maior número de isolados resistentes à ampicilina e à eritromicina nas famílias Pseudomonadaceae e Vibrionaceae. A resistência da família Vibrionaceae à ampicilina é considerada intrínseca (Radu et al., 2003; Schmidt et al., 2001). A família Pseudomonadaceae apresentou frequência de resistência mais alta a um grande número de antibióticos testados (eritromicina, cefuroxima, cloranfenicol, ampicilina e nitrofurantoína). Além disso, bactérias resistentes à norfloxacin e à tetraciclina foram mais frequentes na família Micrococcaceae, enquanto a resistência à gentamicina foi rara em todas as famílias analisadas. Resultados semelhantes foram obtidos por Hatha et al. (2005), que observaram elevados níveis de resistência à amoxicilina (β -lactâmico) e à tetraciclina e de susceptibilidade à gentamicina em *Aeromonas sp.* isoladas do conteúdo intestinal de peixes de água doce.

TABELA 8 Perfil de resistência a antibióticos em isolados bacterianos de diferentes famílias, oriundos de três sistemas de cultivo de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Famílias	Antibióticos*									
	Nº de amostras	NOR	TET	ERI	CFX	CLO	AMP	GEN	SUL	NIT
Enterobacteriaceae	17	1	5	17	8	3	14	1	5	6
Micrococcaceae	21	10	19	7	1	0	3	0	12	2
Pseudomonadaceae	21	2	13	21	20	16	20	2	3	20
Vibrionaceae	21	0	4	20	2	0	20	4	19	0
Não identificadas	18	3	9	14	10	7	12	2	4	6
Total	98	16	50	79	41	26	69	9	43	34

* Antibióticos testados: norfloxacina (NOR), tetraciclina (TET), eritromicina (ERI), cefuroxima (CFX), cloranfenicol (CLO), ampicilina (AMP), gentamicina (GEN), sulfonamidas (SUL), nitrofurantoína (NIT)

4.4 Perfil de múltipla resistência a antibióticos

Os dados da Tabela 9 representam os perfis de múltipla resistência aos antibióticos testados dos isolados bacterianos oriundos dos sistemas de cultivo 1, 2 e 3. Observa-se maior frequência de resistência simultânea a eritromicina, ampicilina e sulfonamidas, pois, dos 98 isolados bacterianos testados, 14 apresentaram este perfil. Além disso, 11% dos isolados bacterianos apresentaram multirresistência a seis antibióticos testados (tetraciclina, eritromicina, cefuroxima, cloranfenicol, ampicilina e nitrofurantoína), 10% foram resistentes à ampicilina e à eritromicina e 8% foram resistentes a norfloxacina, tetraciclina e sulfonamidas, simultaneamente. Os demais perfis de multirresistência aos antibióticos testados apresentaram baixas porcentagens de representantes.

TABELA 9 Perfil de múltipla resistência a antibióticos de isolados bacterianos, oriundos de diferentes sistemas de cultivo de tilápias do nilo

Perfil de múltipla resistência*	Número de isolados resistentes		
	Sistema 1 ^a	Sistema 2 ^b	Sistema 3 ^c
CFX CLO		1	
ERI AMP	3	3	4
ERI NIT	1		
ERI SUL	1		
NOR TET	1	1	
TET ERI		1	2
TET NIT		2	
TET SUL		1	
CFX AMP SUL		2	
ERI AMP SUL	5	5	4
ERI CFX AMP		2	
ERI CFX CLO			1
ERI CFX NIT			1
ERI SUL NIT		1	
NOR TET SUL	5		3
TET CFX CLO			1
TET ERI AMP	1		
TET ERI SUL			1
ERI AMP GEN SUL		1	1
ERI CFX AMP SUL	2	1	
ERI CFX AMP NIT			3
TET ERI AMP SUL	3		1
TET ERI CFX AMP		1	1
ERI CFX CLO AMP NIT		2	2
TET ERI CFX AMP NIT		1	1
TET ERI CFX CLO AMP		1	
TET ERI AMP GEN SUL	1		1
NOR TET ERI CFX SUL NIT		1	
TET ERI CFX CLO AMP NIT	4	5	2
ERI CFX CLO AMP GEN SUL NIT		1	
NOR TET ERI CFX CLO AMP NIT	1		
TET ERI CFX CLO AMP GEN NIT	1		
TET ERI CFX CLO AMP SUL NIT	1		
NOR TET ERI CFX CLO AMP GEN NIT			3
TOTAL	30	32	32

* Antibióticos testados: norfloxacin (NOR), tetraciclina (TET), eritromicina (ERI), cefuroxima (CFX), cloranfenicol (CLO), ampicilina (AMP), gentamicina (GEN), sulfonamidas (SUL), nitrofurantoína (NIT)

a- tanque de alvenaria com arraçoamento; b- tanque de terra com arraçoamento; c- tanque de terra com adubação orgânica

Plasmídeos podem carrear determinantes de resistência simultânea a várias drogas, o que pode levar ao fenômeno de seleção cruzada, aumentando o número de bactérias multirresistentes em determinado ambiente (McPhearson et al., 1991). Mutações no cromossomo bacteriano também estão relacionadas com a múltipla resistência a antibióticos, pois podem codificar sistemas de efluxo que impedem o acúmulo de diversos antibióticos no interior da célula bacteriana. (Miranda & Zemelman, 2002a). Assim, como foi observado porcentagem significativa de resistência simultânea a algumas drogas nos sistemas de cultivo analisados, sugere-se que pode estar havendo a disseminação de elementos genéticos móveis ou a seleção de amostras mutantes nos mesmos. Apesar deste estudo não permitir avaliar se o perfil de multirresistência dos isolados testados se deve a mutações cromossômicas, plasmídeos ou outros elementos genéticos móveis, as bactérias isoladas dos sistemas de cultivo 1, 2 e 3 podem ser consideradas fontes de alto risco para manutenção e disseminação de resistência a múltiplas drogas.

O índice de multirresistência (MAR) aos antibióticos testados foi determinado em relação às famílias bacterianas identificadas, como pode ser observado na Tabela 10. Dentre as 98 amostras bacterianas testadas, 96% apresentaram índice MAR igual ou acima de 0,22, o que caracteriza múltipla resistência. O perfil de multirresistência nos três sistemas analisados foi semelhante, tendo a média dos índices MAR em todos os sistemas sido 0,4. A múltipla resistência a antibióticos é elevada em ambientes onde há utilização constante de drogas (Krumperman, 1983; Vivekanandhan et al., 2002). Porém, neste trabalho, os resultados do índice MAR revelaram que, mesmo na ausência de antimicrobianos nos sistemas de cultivo analisados, a maioria dos isolados bacterianos foi considerada fonte de alto risco para disseminação de genes de resistência.

TABELA 10 Número de populações bacterianas com múltipla resistência a antibióticos representantes das diferentes famílias identificadas

Índice MAR	Famílias bacterianas					Total
	E*	M*	P*	V*	NI*	
0,22	6	7	1	1	5	20
0,33	5	10	0	12	5	32
0,44	2	2	2	5	3	14
0,55	2	0	5	2	0	09
0,66	1	0	9	0	2	12
0,77	0	0	4	0	0	04
0,88	1	0	0	0	2	03
Total	17	19	21	20	17	94

* E= Enterobacteriaceae; M= Micrococcaceae; P= Pseudomonadaceae; V= Vibrionaceae; NI= não identificadas

Empiricamente, considerando-se a resistência simultânea à metade dos antibióticos testados, a família Pseudomonadaceae apresentou maior número de amostras resistentes a cinco ou mais antibióticos (MAR > 0,44), enquanto as outras famílias analisadas apresentaram maior número de bactérias com índice MAR abaixo de 0,44. A multirresistência a antibióticos é freqüente em membros da família Pseudomonadaceae e geralmente está associada a plasmídeos R (Quinn et al., 1994). Representantes da família Micrococcaceae não apresentaram resistência simultânea a mais de quatro antibióticos, o que era esperado, pois bactérias gram-positivas tendem a ser mais susceptíveis à ação de antibióticos do que bactérias gram-negativas.

Neste trabalho, observou-se uma relação entre a família bacteriana e o índice de múltipla resistência a antibióticos. Miranda & Zemelman (2002a) observaram elevada proporção de bactérias resistentes a múltiplas drogas em sistemas de cultivo de salmão no Chile, ocorrendo alta incidência de resistência à amoxicilina e à eritromicina e de susceptibilidade à gentamicina e à

enrofloxacin. Porém, esses autores verificaram que o perfil de múltipla resistência a antibióticos não estava relacionado às espécies bacterianas.

Portanto, a transferência de múltipla resistência a antibióticos é um dos principais problemas decorrentes do uso de antimicrobianos na aquicultura, visto que a pressão de seleção favorece as trocas de genes de resistência entre bactérias do ambiente (Miranda & Zemelman, 2002a). Além disso, a presença de elevado número de bactérias resistentes e multirresistentes no ambiente aquático gera implicações ecológicas e de saúde pública e enfatiza a necessidade de mais estudos, principalmente em relação aos determinantes de resistência em diferentes espécies bacterianas, assim como sobre a possibilidade de transferência de genes de resistência a patógenos humanos por meio do consumo de pescados (Miranda & Zemelman, 2001).

5 CONCLUSÕES

O total de populações bacterianas diferiu entre os sistemas de cultivo analisados. O sistema com adubação orgânica apresentou maior número de bactérias totais e resistentes a antibióticos.

Percentuais de recuperação de bactérias resistentes acima de 80% foram constatados nos diferentes sistemas de cultivo analisados, mesmo sem utilização prévia de antibióticos nos mesmos.

O adubo orgânico foi considerado fonte potencial de contaminação para o sistema no qual foi utilizado.

A maioria dos isolados bacterianos testados apresentou múltipla resistência a antibióticos.

Muitos representantes da família Pseudomonadaceae apresentaram resistência simultânea a mais de cinco antibióticos.

O tipo de sistema de cultivo não influenciou o perfil qualitativo de resistência a antibióticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDERMAN, D. J.; HASTINGS, T. S. Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance – potential for consumer health risks. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 139-155, Apr. 1998.
- ALI ABADI, F. S.; LEES, P. Antibiotic treatment for animals: effect on bacterial population and dosage regimen optimization. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 14, n. 4, p. 307-313, May 2000.
- ARCANGIOLI, M. A.; SÉTRIN, S. L.; MARTEL, J. L.; DANCLA, E. C. A new chloramphenicol and florfenicol resistance gene flanked by two integron structures in *Salmonella typhimurium* DT104. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 174, n. 2, p. 327-332, May 1999.
- BARROS, G. C.; MENDES, E. S.; SANTOS, F. L. Patologia dos peixes. **Revista CFMV**, Brasília, v. 26, p. 44-56, jan./abr. 2002.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C. TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standard single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, Chicago, v. 36, n. 4, p. 493-496, 1966.
- BOARI, C. A. **Isolamento, caracterização de microrganismos deteriorantes e patogênicos associados à produção de filés de tilápia (*Oreochromis niloticus*)**. 2004. 43 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- BOGAARD, A. E.; STOBBERINGH, E. E. Epidemiology of resistance to antibiotics Links between animals and humans. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 14, n. 4, p. 327-335, May 2000.
- BRUUN, M. S.; MADSEN, L.; DALSGAARD, I. Efficiency of oxytetracycline treatment in rainbow trout experimentally infected with *Flavobacterium psychrophilum* strains having different *in vitro* antibiotic susceptibilities. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 215, n. 1/4, p. 11-20, Jan. 2003.
- BUTAYE, P.; CLOECKAERT, A.; SCHWARZ, S. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative

bacteria. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 22, n. 3, p. 205-210, Sept. 2003.

CECCARELLI, P. S.; FIGUEIRA, L. B. Possíveis problemas de saúde devido ao uso de excretas na aquicultura. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 63, p. 38-40, jan./fev. 2001.

DAVISON, H. C.; LOW, C.; WOOLHOUSE, M. E. J. What is antibiotic resistance and how can we measure it? **Trends in Microbiology**, London, v. 8, n. 12, p. 554-559, Dec. 2000.

DEPAOLA, A.; PEELER, J. T.; RODRICK, G. E. Effect of oxytetracycline-medicated feed on antibiotic resistance of gram-negative bacteria in catfish ponds. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 6, p. 2335-2340, June 1995.

EL-SHAFI, S. A.; GIJZEN, H. J.; NASR, F. A.; EL-GOHARY, F. A. Microbial quality of tilapia reared in fecal-contaminated ponds. **Environmental Research**, San Diego, v. 95, n. 2, p. 231-238, June 2004.

GARCIA-LÓPEZ, I.; OTERO, A.; GARCIA-LÓPEZ, M. L.; SANTOS, J. A. Molecular and phenotypic characterization of nonmotile Gram-negative bacteria associated with spoilage of freshwater fish. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, n. 4, p. 878-886, 2004.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Varela, 2001. 629 p.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S.; OLIVEIRA, C. A. F. Aspectos da qualidade do pescado de relevância em saúde pública. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 12, n. 53, p. 30-37, 1998.

GIANNINI, D.; PARIM, M. A.; GADALETA, L.; CARRIZO, G.; ZUGARRAMURDI, A. Influence of raw material quality on quality of iced and frozen white fish products. **Journal of Food Quality**, Trumbull, v. 24, n. 6, p. 527-538, Dec. 2001.

GONI-URRIZA, M.; CAPDEPUY, M.; ARPIN, C.; RAYMOND, N.; CAUMETTE, P.; QUENTIN, C. Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas spp.* **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 1, p. 125-132, Jan. 2000.

GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M. N.; SANZ, J. J.; SANTOS, J. A.; OTERO, A.; GARCÍA-LÓPEZ, M. L. Foodborne pathogenic bacteria in prepackaged fresh retail portions of farmed rainbow trout and salmon stored at 3°C. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 76, n. 1/2, p. 135-141, June 2002.

HARRIGAN, W. F. **Laboratory methods in food microbiology**. 3. ed. San Diego: Academic, 1998.

HATHA, M.; VIVEKANANDHAN, A. A.; JOICE, G. J.; CHRISTOL Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 98, n. 2, p. 131-134, Feb. 2005.

HAWKEY, P. M. Mechanisms of quinolone action and microbial response. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 51, p. 29-35, May 2003. Supplement 1.

HÖLMSTROM, K.; GRÄSLUND, S.; WAHLSTRÖM, A.; POUNGSHOMPOO, S.; BENGSTSSON, B.; KAUTSKY, N. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. **International Journal of Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 38, n. 3, p. 255-266, Mar. 2003.

HOWGATE, P. Review of the public health safety of products from aquacultured. **International Journal of Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 33, n. 2, p. 99-125, Apr. 1998.

HUSS, H. H. **Assurance of seafood quality**. ROMA: FAO, 1994. 169 p. (FAO Fisheries technical paper, n. 334).

HUSS, H. H.; REILLY, A.; EMBAREK, K. B. Prevention and control of hazards in seafood. **Food Control**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 149-156, Apr. 2000.

KRUMPERMAN, P. H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Applied and Environmental Microbiology**, Amsterdam, v. 46, n. 1, p. 165-170, July 1983.

KRUSE, H.; SORUM, H. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. **Applied and Environmental Microbiology**, Amsterdam, v. 60, n. 11, p. 4015-4021, Nov. 1994.

KUBITZA, F. Alternativa 3- Estratégias de produção baseadas na adubação dos viveiros. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 63, p. 40-42, jan./fev. 2001.

KUBITZA, F. A evolução da tilapicultura no Brasil: produção e mercados. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 76, p. 25-35, mar./abr. 2003.

LIMA, R. M. S. **Quantificação de bactérias resistentes a antibióticos em ambiente de criação e filés de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2004. 49 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MARTINS, C. V.; VAZ, S. K. Aspectos sanitários de pescados comercializados em pesque pagues de Toledo- PR. **Higiene alimentar**, São Paulo, v. 16, p. 51-56, 2002.

MCKEEGAN, K. S.; WALMSLEY, M. I. B.; WALMSLEY, A. R. Microbial and viral drug resistance mechanisms. **Trends in Microbiology**, London, v. 10, n. 10, p. S8-14, 2002. Supplement.

MCPHEARSON, R. M.; DEPAOLA, A.; ZYWNO, S. R.; MOTES JR. , M. L.; GUARINO, A. M. Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria from cultured catfish and aquaculture ponds. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 99, n. 3/4, p. 203-211, Dec. 1991.

MICHEL, C.; KEROAULT, B.; MARTIN, C. Chloramphenicol and florfenicol susceptibility of fish-pathogenic bacteria isolated in France: comparison of minimum inhibitory concentration, using recommended provisory standards for fish bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, n. 5, p. 1008-1015, 2003.

MIETTINEM, H.; AARINSALO, K.; SALO, S.; SJÖBERG, A. M. Evaluation of surface contamination and the presence of *Listeria monocytogenes* in fish processing factories. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 5, p. 635-639, May 2001.

MIRANDA, C. D.; ZEMELMAN, R. Antibiotic resistant bacteria in fish from Concepción Bay, Chile. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 42, n. 11, p. 1096-1102, Nov. 2001.

MIRANDA, C. D.; ZEMELMAN, R. Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 293, n. 1/3, p. 207-218, July 2002a.

MIRANDA, C. D.; ZEMELMAN, R. Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 212, n. 1/4, p. 31-47, Sept. 2002b.

MURATORI, M. C. S.; RIBEIRO, L. P.; MIRANDA, M. O. T.; LIMA, L. C.; HOLANDA, E. D.; QUEIROZ, B. M.; TURRA, E. M. Aspectos higiênicos-sanitários na produção de peixes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, n. 203, p. 62-64, mar./abr. 2000.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STUDIES. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. 4. ed. Villanova, USA, 1990. (NCCLS document M2-A4).

NOGA, E. J. **Fish disease: diagnostic and treatment**. St. Louis: Mosby, 1996. 367 p.

OETTERER, M. **Industrialização do pescado cultivado**. Guaíba: Agropecuária, 2002. 200 p.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Sampling Procedures. In: _____. **Diagnostic manual for aquatic animal diseases**. Paris: OIE, 2001. Chapt. I. 1. B.

OSTRENSKY, A.; BOEGER, W. A. **Piscicultura : fundamentos e técnicas de manejo**. Guaíba: Agropecuária, 1998. 211 p.

PETERSEN, A.; ANDERSEN, J. S.; KAEWMAK, T.; SOMSIRI, T.; DALSGAARD, A. Impact of integrated fish farming on antimicrobial resistance in a pond environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 12, p. 6036-6042, Dec. 2002.

PETERSEN, A.; DALSGAARD, A. Antimicrobial resistance of intestinal *Aeromonas spp.* and *Enterococcus spp.* in fish cultured in integrated broiler-fish farms in Thailand. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 219, n. 1/4, p. 71-82, Apr. 2003a.

PETERSEN, A.; DALSGAARD, A. Species composition and antimicrobial resistance genes of *Enterococcus spp.*, isolated from integrated and traditional fish farms in Thailand. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, n. 5, p. 395-402, May 2003b.

PRATA, L. F. **Manual de inspeção higiênico-sanitária e tecnológica de carne, pescado e derivados**. São Paulo: FCAV/UNESP, 1997. 125 p.

QUINN, P. J.; CARTIER, M. E.; MARKEY, B. **Clinical veterinary microbiology**. London: Wolfe, 1994, 648 p.

RADU, S.; AHMAD, N.; LING, F. H.; REEZAL, A. Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species from retail fish in Malaysia. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 81, n. 3, p. 261-266, Mar. 2003.

RAMOS, M.; LYON, W. J. Reduction of endogenous bacteria associated with catfish using grovac process. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 63, n. 9, p. 1231-1239, Sept. 2000.

RASGUIDO, J. E.; ALBANEZ, J. R. Piscicultura em Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, n. 203, p. 32-37, mar./abr. 2000.

RHODES, G.; HUYS, G.; SWINGS, J.; MCGANN, P.; HINEY, M.; SMITH, P.; PICKUP, R. W. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 9, p. 3883-3890, Sept. 2000.

RIVERA-TAPIA, J. A. Antibiotic resistance, public health problem. **Anales Medicos Hospital ABC**, v. 48, n. 4, p. 42-47, 2003.

ROUBACH, R.; CORREIA, E. S.; ZAIDEN, S.; MARTINO, R. C.; CAVALLI, R. O. Aqüicultura brasileira. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 76, p. 47-57, mar./abr. 2003.

SCHMIDT, A. S.; BRUUN, M.; DALSGAARD, I.; LARSEN, J. L. Incidence, distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile aeromonads from a fish farming environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 12, p. 5675-5682, Dec. 2001.

SMITH, J. T.; LEWIN, C. S. Mechanisms of antimicrobial resistance and implications for epidemiology. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 35, n. 3/4, p. 233-242, June 1993.

SON, R.; RUSUL, G.; SAHILAH, A. M.; ZAINURI, A.; RAHA, A. R.; SALMAH, I. Antibiotic resistance and plasmid profile of *Aeromonas hydrophila* isolates from cultured fish, *Telapia (Telapia mossambica)*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 24, n. 6, p. 479-482, June 1997.

SORUM, H.; ABÉE-LUND, T. M. Antibiotic resistance in food-related bacteria – a result of interfering with the global web of bacterial genetics. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 78, n. 1/2, p. 43-56, Sept. 2002.

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

TAKEUCHI, K.; TOMITA, H.; FUJIMOTO, S.; KUDO, M.; KUWANO, H.; IKE, Y. Drug resistance of *Enterococcus faecium* clinical isolates and the conjugative transfer of gentamicin and erythromycin resistance traits. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 243, n. 2, p. 347-354, Feb. 2005.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. São Paulo: Ateneu, 1993. 770 p.

TENDENCIA, E. A.; DELA PEÑA, D. P. Level and percentage recovery of resistance to oxitetracycline and oxolinic acid of bacteria from shrimp ponds. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 213, n. 1/4, p. 1-13, Oct. 2002.

VALENTI, W. C.; POTI, C. R.; PEREIRA, J. A.; BORGHETTI, J. R. **Aqüicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável**. Brasília: CNPq/ Ministério da Ciência e Tecnologia, 2000. 399 p.

VIÉGAS, E. M. M.; SOUZA, M. L. R. Pré-processamento e conservação de peixes cultivados. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATTI, E. C.; FRACALLOSSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. 533 p.

VIVEKANANDHAN, G.; SAVITHAMI, K.; HATHA, A. A. M.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India. **International Journal of Food Microbiology**, Philadelphia, v. 76, n. 1/2, p. 165-168, June 2002.

WEGENER, H. C.; MOLLER, N. F. Reducing the use of antimicrobial agents in animals and man. **Journal of Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 49, n. 2, p. 111-113, Feb. 2000.

WITTE, W. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 14, p. 321-325, 2000.

ZHAO, S.; DATTA, A. R.; AYERS, S.; FRIEDMAN, S.; WALKER, R. D.; WHITE, D. G. Antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from imported foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 84, n. 1, p. 87-92, July 2003.

ANEXOS

ANEXO A

Página

TABELA 1A	Quadro resumo da análise de variância e respectivos níveis de significância para o teste F, para os fatores microambientais (M) e antibióticos (A), sendo sistemas de cultivo (S) considerados blocos.....	60
TABELA 2A	Valores de “t” e respectivos níveis de significância para as variáveis sistema de cultivo 2 (S2), sistema de cultivo 3 (S3), água de abastecimento (AA), água de cultivo (AC), ração (Rc), muco de superfície (R), conteúdo intestinal (CI), em relação aos antibióticos, norfloxacina (NF), cloranfenicol (CL), tetraciclina (TT) e controle (CO). O intercepto representa a média do tratamento sistema de cultivo 1 (S1), com adubo orgânico e ampicilina	60

TABELA 1A Quadro resumo da análise de variância e respectivos níveis de significância para o teste F, para os fatores microambientais (M) e antibióticos (A), sendo sistemas de cultivo (S) considerados blocos

FV	GL	Sq	Qm	F	P(>F)
S	2	81,91	40,95	51,3024	<2,2e-16***
M	5	356,76	71,35	89,3837	<2,2e-16***
A	4	274,87	68,72	86,0826	<2,2e-16***
M:A	20	143,18	7,16	8,9684	6,643e-16***
Resíduos	123	98,19	0,80		

Códigos de significância: 0`***`0,001`**`0,01`*`0,05`.`0,1`´1

TABELA 2A Valores de "t" e respectivos níveis de significância para as variáveis sistema de cultivo 2 (S2), sistema de cultivo 3 (S3), água de abastecimento (AA), água de cultivo (AC), ração (Rc), muco de superfície (R), conteúdo intestinal (CI), em relação aos antibióticos, norfloxacina (NF), cloranfenicol (CL), tetraciclina (TT) e controle (CO). O intercepto representa a média do tratamento sistema de cultivo 1 (S1), com adubo orgânico e ampicilina

Fonte de variação	Estimativa	Erro padrão	Valor de "t"	P(>t)
Intercepto	8,8492	0,9130	9,692	<2e-16***
S2	-0,6890	0,1810	-3,807	0,000220***
S3	0,3708	0,1879	1,973	0,050691
AA	-6,2659	0,9834	-6,372	3,39e-09***
AC	-6,0979	0,9834	-6,201	7,79e-09***
Rc	-8,5047	1,1057	-7,692	4,02e-12***
R	-5,8876	0,9477	-6,213	7,37e-09***
CI	-2,2020	0,9477	-2,324	0,021791*
NF	-2,5700	1,2635	-2,034	0,044107*
CI:NF	-3,9711	1,3319	-2,982	0,003458**
AA:NF	2,6820	1,3841	1,938	0,054958.
Rc:NF	2,5700	1,5475	1,661	0,099318.

Códigos de significância: 0`***`0,001`**`0,01`*`0,05`.`0,1`´1