

**QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS
RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS EM
AMBIENTE DE CRIAÇÃO E FILÉS DE
TILÁPIAS DO NILO
(*Oreochromis niloticus*)**

REJEANA MÁRCIA SANTOS LIMA

2004

REJEANA MARCIA SANTOS LIMA

**QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES A
ANTIBIÓTICOS EM AMBIENTE DE CRIAÇÃO E
FILÉS DE TILÁPIAS 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

Prof. Henrique César Pereira Figueiredo

**LAVRAS
MINAS GERAIS -
2004**

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

Lima, Rejeana Márcia Santos

Quantificação de bactérias resistentes a antibióticos em ambiente
de criação e filés de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) / Rejeana
Márcia Santos Lima. -- Lavras : UFLA, 2004.

49 p. : il.

Orientador: Henrique César Pereira Figueiredo.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Bactéria. 2. Resistência a antibióticos. 3. Tilápia do nilo. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-576.163

REJEANA MARCIA SANTOS LIMA

**QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS
EM AMBIENTE DE CRIAÇÃO E FILÉS DE TILÁPIAS DO NILO
(*Oreochromis niloticus*)**

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

APROVADA em 22 de junho de 2004

Prof. Roberta Hilsdorf Picolli

UFLA

Prof. Júlio S. de S. Bueno Filho

UFLA

Prof. Rômulo Cerqueira Leite

UFMG


Prof. Henrique César Pereira Figueiredo
UFLA
(Orientador)

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL**

Aos meus pais Benedito e Ires, pelo exemplo de vida e amor dedicado.

À minha amada avó Marina, pelo exemplo de vida e dedicação.

Aos meus irmãos Roseana, Rubem Jorge e Pedro Lucas, pela amizade e apoio.

Aos meus sobrinhos João Gabriel e Vitor José, pelas alegrias proporcionadas.

À Claudia, pela amizade e apoio; enfim, a toda a minha família.

Ofereço

A meu marido, Barbosa,
pelo amor incondicional.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo direcionamento dos meus caminhos para cumprir mais esta etapa.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela oportunidade de realização do mestrado.

À FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

Ao Governo Federal, por meio da Escola Agrotécnica Federal de São Luiz-MA, pela concessão de liberação para a realização deste curso.

Ao Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Medicina Veterinária (DMV) da (UFLA), pelas instalações para a realização do experimento.

Ao setor de Piscicultura do Departamento de Zootecnia (DZO) da (UFLA), pela cessão das instalações para realização do experimento.

Ao professor Henrique César Pereira Figueiredo, pela excelente orientação, amizade construída, ensinamentos, confiança e apoio.

À professora Roberta Hilsdorf Picolli, pela confiança, orientação, amizade e presença em momentos importantes.

Ao professor Júlio S. de S. Bueno Filho (DEX), pela disponibilidade e orientação nas análises estatísticas.

Às queridas amigas de pós-graduação Rita, Sueli, Melissa, Ana Carla e Ellen, pela amizade, carinho e alegrias conquistadas.

Às amigas Carmozene, Marlucia e Ênia, pela amizade, incentivo e apoio em momentos decisivos.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia Gláucia, Dircéia, Daniela Carneiro, Flaviane, Delton, Daniela Hirsh e ao Professor Geraldo Márcio da Costa (DMV) pela ajuda no experimento e amizade construída durante esse período.

À amiga Lenka Lacerda, pelos telefonemas, amizade e incentivo.

Aos colegas da Escola Agrotécnica Federal de São Luís-MA, pelas orações e torcida positiva.

Aos funcionários de DMV. DCA e Setor de Piscicultura (DZO), pela atenção.

Enfim, a todos aqueles não mencionados, mas que estão presentes em minha vida, obrigada!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	03
2.1 Produção e consumo de pescado.....	03
2.2 Microbiota e contaminação bacteriana do pescado.....	05
2.3 Resistência bacteriana aos antibióticos.....	07
2.4 Aquicultura e a resistência a antibióticos.....	11
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. Delineamento experimental.....	13
3.2 Piscicultura de tilápias (<i>Oreochromis niloticus</i>)	14
3.3 Amostras coletadas.....	15
3.3.1 Peixes.....	15
3.3.2 Água do sistema de cultivo.....	15
3.3.3 Ração.....	16
3.3.4 Filés de tilápias do Nilo.....	16
3.3.6 Água de torneira.....	16
3.4 Quantificação das populações bacterianas.....	17
3.4.1 Meios de cultura e condições de cultivo.....	17
3.4.2 Microbiota das superfícies das tilápias.....	17
3.4.3 Conteúdo intestinal.....	18
3.4.4 Água de tanque, abastecimento e torneira.....	18
3.4.5 Ração.....	18
3.4.6 Filés de tilápias frescos.....	19
3.4.7 Filés de tilápias congelados.....	19

3.5 Análise qualitativa.....	19
3.5.1 Identificação das principais famílias bacterianas.....	19
3.5.2 Perfil de resistência a antibióticos.....	20
3.5.3 Perfil de multirresistência.....	20
3.6 Análise estatística.....	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1 Parâmetros limnológicos.....	23
4.2 Populações bacterianas resistentes aos antibióticos testados.....	24
4.3 Frequência das famílias de bactérias resistentes aos antibióticos testados.....	30
4.4 Perfil de resistência aos antibióticos.....	32
5 CONCLUSÕES.....	40
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
ANEXOS.....	48

RESUMO

LIMA, Rejeana Márcia Santos. **Quantificação de bactérias resistentes a antibióticos em ambiente de criação e filés de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*)**. Lavras: UFLA, 2004. 49p. (Dissertação - Mestrado em Ciência dos Alimentos)*

O objetivo deste trabalho foi verificar a diversidade de resistência a antibióticos em populações bacterianas oriundas do ambiente de criação de peixes cultivados e filés de pescado. De uma piscicultura de tilápias (*Oreochromis niloticus*) em tanques de terra, sem utilização de antibióticos, foi selecionado um tanque, capturados 15 peixes e coletadas amostras de conteúdo intestinal e superfície dos peixes, água de abastecimento e do tanque, ração farelada, filés de tilápias frescos e após congelamento. As amostras foram submetidas à quantificação de populações bacterianas resistentes a cloranfenicol, tetraciclina, norfloxacin e ampicilina. Colônias representativas das populações resistentes foram analisadas pelos testes de Gram, catalase, oxidase e oxidação-fermentação. Foram selecionadas 89 amostras e submetidas a antibiograma, segundo Bauer-Kirby, utilizando vários antibióticos. As populações bacterianas no ambiente de criação apresentaram-se mais altas no conteúdo intestinal ($P < 0,001$), na ração ($P < 0,001$) e no lavado de superfície ($P < 0,01$) e mais baixas na água de abastecimento ($P < 0,01$). Maiores populações de bactérias foram observadas no ambiente de criação (conteúdo intestinal, lavado de superfície e ração) do que nos filés de tilápias (filés frescos e congelados). As populações de bactérias resistentes à norfloxacin foram superiores em todos os ambientes avaliados quando comparadas às de conteúdo intestinal ($P < 0,001$), em que não houve populações resistentes a essa droga. Em filés de tilápias frescos tais populações resistentes foram observadas, entretanto, não sobreviveram ao processo de congelamento utilizado. Os percentuais de recuperação de bactérias resistentes aos antimicrobianos de modo geral foram considerados altos para um ambiente sem uso destas drogas. A maioria das bactérias pertenceu às famílias *Enterobacteriaceae* e *Vibrionaceae*. Tanto no ambiente de criação como nos filés de tilápias observou-se que os isolados apresentaram-se resistentes principalmente a ampicilina e eritromicina. Do total de 89 isolados analisados 74 (83%), apresentaram índice de múltipla resistência a antibióticos (MAR) $\geq 0,2$, ou seja apresentaram-se resistentes a dois ou mais antibióticos.

* Comitê orientador: Henrique César Pereira Figueiredo - UFLA (Orientador) e Roberta Hilsdorf Piccoli - UFLA

ABSTRACT

LIMA, Rejeana Márcia Santos. **Quantification of antibiotic resistant bacteria in fish pond and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets.** Lavras: UFLA, 2004. 49p. (Dissertation- Master in Food Science)*

The aim of this study was to verify the diversity of the antibiotic resistant bacterial populations from fish pond and fish fillets. This study was conducted in a freshwater tilapia farm that has not used any antibiotic. It was selected one pond, caught 15 fishes and collected samples of intestinal content and mucus surface, water influent and pond water, ration, fresh tilapia fillets and frozen fillets. The populations of ampicillin, cloranfenicol, tetracycline and norfloxacin resistant bacteria were determined. Phenotypical characteristics as Gram stain, oxidase production, oxidative-fermentative utilization of glucose (O-F) were determined to representative colonies of resistant populations. Were selected 89 strains and submitted for antimicrobial sensitivity test using several antibiotics. Antibiotic resistant bacteria were higher in intestinal content ($P < 0,001$), ration ($P < 0,001$) and fish surface ($P < 0,01$) and lower in influent water ($P < 0,01$). Higher bacterial populations were observed in pond environment (intestinal content, fish surface and ration) than tilapia fillets (fresh and frozen). The norfloxacin resistant bacterial populations were higher in all tested samples than intestinal content ($P < 0,001$), which no have resistant norfloxacin populations. In fresh tilapia fillets this populations were observed, however it not survive after freezing. The percentage recovery of resistant bacteria was considered high for a fish farm that not uses antibiotics. The main identified bacterial families were belonged *Enterobacteriaceae* and *Vibrionaceae*. The most isolates showed resistance to ampicillin and erythromycin. From the 89 isolates evaluated 74 (83%) showed a multiple antibiotic resistance index (MAR) ≥ 0.2 , that mean resistance to two or more antibiotics.

*Guidance Committee: Henrique César Pereira Figueiredo – UFLA (Major Professor) and Roberta Hilsdorf Piccoli (UFLA)

1 INTRODUÇÃO

A piscicultura de água doce, nos últimos anos, tem apresentado considerável aumento da produção e produtividade, embora seja uma atividade relativamente recente como exploração econômica.

A maioria do pescado comercializado é oriunda do abate manual, adquirido e consumido logo após a despesca. Portanto, o produto é vendido “in natura” destinado ao mercado local e regional.

A maneira como grande parte do pescado é processada e comercializada, possibilita o aumento de ocorrência de doenças transmitidas por este alimento. Dentre as principais doenças veiculadas pelo pescado estão as toxinfecções bacterianas, que podem ser decorrentes de contaminação direta dos peixes pela sua microbiota natural, ou indireta, durante as diversas fases do processamento. Esse tipo de contaminação tem particular importância quando os produtos são consumidos crus ou após tratamento térmico brando.

A presença de bactérias resistentes a antibióticos nos alimentos representa um sério risco para o consumidor e, conseqüentemente, grave problema de saúde pública mundial. Além da veiculação de bactérias potencialmente patogênicas, a ingestão de pescado contaminado também possibilita a inserção de bactérias resistentes a antibióticos na cadeia alimentar humana. Essas bactérias, uma vez ingeridas, podem transferir genes de resistência a bactérias patogênicas ou àquelas presentes na microbiota do homem. Essa preocupação tem levado a vários estudos sobre os diversos mecanismos pelos quais estas bactérias provenientes do meio ambiente, do ambiente de produção animal e de outros meios, transferem genes de resistência a antibióticos.

Vários ambientes, dentre eles o aquícola, são apontados como importantes meios para a seleção de espécies bacterianas resistentes aos mais diversos antibióticos, tendo em vista que essas drogas são usadas para o tratamento e profilaxia de doenças bacterianas em peixes, muitas vezes de forma indiscriminada.

Até o momento, no Brasil, há poucas informações sobre resistência de bactérias a antibióticos em espécies de peixes de água doce cultivados, a despeito do fato de o peixe ser componente importante da dieta da população e da sua expressiva produção no país.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi verificar a diversidade de resistência a antibióticos em populações bacterianas oriundas do ambiente de criação de peixes cultivados e a possibilidade de carreamento de tais populações para os filés, durante o abate e processamento.

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 e desempenham, na economia de muitos países importante papel, em consequência de sua abundância e excelente composição nutricional. A maior parcela da produção da aquicultura vem de países em desenvolvimento, destacando-se o continente asiático (Huss et al., 2000; Martins & Vaz, 2002; Barros et al., 2002).

A aquicultura brasileira vem apresentando altas taxas de crescimento nos últimos anos. Segundo dados da Food and Agriculture Organization of United States (1999), a média é de 30% ao ano, índice superior à média mundial, que é de 10%. Esta atividade poderá dobrar o consumo de pescado no país nos próximos 10 anos, uma vez que a pesca extrativa, tanto marinha como de águas interiores, situa-se abaixo da metade do seu potencial e com tendência à estabilização ou queda. A produção brasileira é caracterizada pelas pequenas propriedades, sendo esta uma característica encontrada também nos principais países produtores do setor aquícola. Outra característica importante da aquicultura brasileira é a diversidade de espécies cultivadas, apresentando número superior a 64 (Oetterer, 2002; Roubach et al., 2003).

Existem seis áreas principais na aquicultura, definidas pelos grupos de organismos cultivados: peixes de água doce, camarões marinhos, mexilhões, ostras, camarões de água doce e rãs. O setor de peixes de água doce é o único presente em todos os estados do país, sendo responsável por cerca de 80% de toda a produção da aquicultura (Valenti et al., 2000).

As espécies não nativas ainda predominam na piscicultura, como é o caso da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), introduzida no Brasil em 1971,

sendo popular na maioria das regiões. A produção de tilápias em cultivos semi-intensivos e intensivos é estimada entre 40 e 50 mil toneladas anualmente, o que representa a metade da produção brasileira de pescado cultivado. O potencial piscícola da tilápia para pequenos produtores se deve a características da espécie, como resistência ao manuseio e transporte, facilidade de arraçoamento, crescimento rápido, resistência a baixas concentrações de oxigênio dissolvido, além de apresentar carne de sabor agradável e com poucas espinhas (Oetterer, 2002; Kubitz, 2003).

Em contraste com a produção, o consumo “per capita” de pescado “in natura” no Brasil é ainda muito baixo (6 kg/hab./ano), quando comparado ao das outras fontes de proteína de origem animal, como carne de aves (25kg/ano) e carnes vermelhas (bovina, 29kg/ano e suína, 10kg/ano). Isso se deve à falta de tradição, pequena oferta do produto, entre outros. Apenas 10% da população incorporam o pescado na alimentação e o hábito de ingerir pescado varia de acordo com a região, oscilando entre 21% no norte e nordeste e 2% na região sul. Contudo, este consumo apresenta potencial de crescimento expressivo (Rasguido & Albanes, 2000; Germano & Germano, 2001; Kubitz, 2003).

Os produtos oriundos da aquicultura são vendidos diretamente ao consumidor ou comercializados em feiras livres, supermercados, restaurantes, hotéis, pesque e pague e indústria de alimentação (Roubach et al., 2003).

A cadeia produtiva do setor aquícola brasileiro, entretanto, ainda apresenta pouca expressividade, principalmente no que se refere à transformação e à industrialização da produção. Poucas são as regiões ou atividades que estão suficientemente organizadas para produzir na escala e na periodicidade que justificam a instalação e o funcionamento de unidades processadoras (Borghetti & Ostrensky, 2000). Na prática, a cadeia produtiva da aquicultura deve ser analisada e trabalhada de forma integral, visando a construção de unidades de produção e processamento de pescado que se adequem às necessidades do

consumidor, levando em consideração a segurança e qualidade do pescado produzido.

2.2 Microbiota e contaminação bacteriana do pescado

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 intestinos dos peixes (Prata, 1997).

De modo geral, o número e as espécies de bactérias isoladas nos peixes refletem vários aspectos, dentre eles condições físico-químicas do ambiente aquático (pH, temperatura, etc.); interações entre microrganismos e peixes (localização da bactéria, microbiota residente, transiente); práticas de coleta dos peixes (captura, avaliação do sabor de terra ou de barro); manipulação (transporte, armazenamento) e os métodos desenvolvidos para isolamento (tipo de meio de cultura, temperatura, duração, natureza do ambiente de incubação, presença ou ausência de O₂) (Ramos & Lyon, 2000).

A microbiota do trato gastrointestinal de peixes é constituída basicamente de bactérias aeróbicas, anaeróbicas facultativas e anaeróbicas obrigatórias, mas esta composição pode ser alterada em função da idade, tipo de alimento consumido e condições ambientais. A microbiota intestinal tem sido classificada como autóctone ou indígena e alóctone ou transiente (Ringo et al., 2003). Os peixes têm em seu intestino grande diversidade de bactérias oriundas da água, sedimentos e alimentação, sugerindo que a microbiota intestinal reflete o ambiente aquático em que eles vivem (Al-Harbi, 2003). Em função disso, peixes capturados em ambientes poluídos por esgotos e dejetos em geral albergam indicadores de poluição fecal e microrganismos potencialmente patogênicos (Muratori et al., 2000; Garcia-Lopez et al., 2004).

As bactérias veiculadas pelo pescado são geralmente divididas em dois grupos: aquelas que são próprias do ambiente aquático dos quais o pescado foi obtido (bactérias indígenas) e aquelas presentes como resultado de contaminação do ambiente aquático pelo homem ou animal. Um terceiro grupo é, às vezes, considerado e inclui bactérias introduzidas nos peixes e seus produtos durante a manipulação e processamento pós-despesca (Howgate, 1998).

A carne do pescado é inicialmente estéril, mas pode ser contaminada por uma variedade de microrganismos; contudo somente uma parte desses contaminantes é capaz de colonizar o alimento e se multiplicar. Microrganismos oriundos da pele, brânquias e trato gastrointestinal podem ser difundidos durante o abate e o processamento dos peixes. Dentre as bactérias mais importantes nestas etapas, destacam-se os gêneros: *Vibrio*, *Salmonella*, *Proteus*, *Shigella*, *Bacillus*, *Enterobacter spp.*, *Pseudomonas*, *Aeromonas spp.*, *Flavobacterium spp.*, *Enterococcus*, além de coliformes termotolerantes que podem ser encontrados nos peixes frescos ou congelados. A maioria desses microrganismos está relacionada com a qualidade da água utilizada nas operações de abate, do gelo e demais procedimentos pós-captura (Gram & Huss, 1996; Ramos & Lyon, 2000; Germano & Germano, 2001; Martins & Vaz, 2002).

Nos últimos anos, tem-se acompanhado o aumento da procura de peixes crus prontos para consumo (sushis, sashimis), principalmente nos grandes centros. Este fato tem sido preocupante, devido à segurança microbiológica necessária, sendo essencial especialmente para produtos consumidos crus ou que sofrem pouca cocção (Germano & Germano, 2001; Giannini et al., 2001; Miettinen et al., 2001).

2.3 Resistência bacteriana aos antibióticos

A resistência antimicrobiana é frequentemente definida dentro de um contexto clínico e mais raramente como atributo epidemiológico. Assim, uma bactéria é dita resistente a determinado antibiótico quando o microrganismo é capaz de crescer *in vitro* em presença da concentração que a droga atinge no sangue, de acordo com as recomendações terapêuticas (Tavares, 1993; Davison et al., 2000).

As bactérias podem ser naturalmente resistentes aos mais diversos antibióticos, podendo esta ser uma característica intrínseca que faz parte das características biológicas primitivas destes microrganismos. Este tipo de resistência resulta de genes localizados no cromossomo, que codificam na célula estruturas ou mecanismos que impedem o antibiótico de agir em seu receptor. Esses genes podem também codificar inibidores da expressão de sítios de ação da droga ou ainda determinar a expressão de receptores inadequados para a ligação com uma substância específica (Tavares, 1993).

Os microrganismos têm desenvolvido numerosos mecanismos que os capacitam a livrar-se dos efeitos dos antibióticos. Como resultado, muitos têm se tornado resistentes a quase todos os meios disponíveis de tratamento. Este problema, embora não seja novo, tem crescido consideravelmente. Torna-se, portanto, fundamental o entendimento dos mecanismos de resistência a antibióticos que os microrganismos desenvolvem, sendo esse fato essencial para determinar os avanços e caminhos para o combate deste problema (McKeegan et al., 2002).

A resistência bacteriana adquirida pode resultar de mutação intrínseca em um gene cromossômico ou da aquisição de material genético exógeno carregado por outras bactérias (Walsh et al., 2001).

As bactérias apresentam grande flexibilidade genética e têm capacidade de transferência horizontal de genes de resistência, por meio de elementos

genéticos móveis como plasmídios, bacteriófagos, transposons conjugativos e elementos IS. Tais elementos podem ser transferidos entre bactérias da mesma espécie, bem como entre aquelas filogeneticamente distantes e de habitats distintos (Madigan et al., 1994; Heuer et al., 2002; Tapia, 2003). Análises moleculares de genes de resistência a antibióticos em plasmídios e transposons têm demonstrado que elementos idênticos são encontrados em bactérias associadas aos animais e ao homem, sendo este fenômeno aplicado a patógenos veiculados por alimentos, bactérias oportunistas e da microbiota (Teuber, 2001; Blake et al., 2003; Holmström et al., 2003).

Estudos recentes têm enfatizado a transferência de genes de resistência entre bactérias do meio ambiente e bactérias potencialmente patogênicas e também indicam possível conexão entre o uso de antibióticos em animais e o crescimento da resistência em patógenos de seres humanos. Os alimentos, a água e o contato direto podem ser responsáveis pela difusão de bactérias resistentes a antibióticos da microbiota animal para a do homem (Teuber, 2001; Sorum & L'Abée-Lund, 2002).

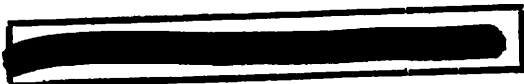
A maioria dos estudos para elucidar a ocorrência e a persistência da resistência a antibióticos tem sido direcionada a bovinos, suínos e aves e poucos relacionam este problema à piscicultura. Alguns relatos de resistência de bactérias a antibióticos em peixes têm sido encontrados nas mais diversas áreas da aquicultura, evidenciando principalmente bactérias patogênicas e nos sistemas aquícolas marinhos, principalmente nas criações de salmão (Bruun et al., 2003; Hameed et al., 2003). No entanto, poucos trabalhos têm relatado a ocorrência deste problema nos cultivos de água doce e a veiculação ao homem por meio da ingestão do pescado.

A descoberta dos agentes antibióticos representou um dos maiores avanços da medicina durante o século 20 e sua utilização, a partir da década de 1940, provocou uma revolução no tratamento das doenças bacterianas em seres

humanos que até então eram consideradas fatais. A utilização de antibióticos na medicina, medicina veterinária e na agricultura, por mais de 50 anos, tem causado grande impacto na seleção de populações bacterianas resistentes. O uso de antibióticos torna-se um problema ainda mais sério em países em desenvolvimento, onde estes são utilizados amplamente, muitas vezes de maneira indiscriminada (Smith & Lerwin, 1993; Heuer et al., 2002; Vivekanandhan et al., 2002).

Em torno de 8 milhões de quilogramas de antibióticos são administrados em animais, a cada ano, nos Estados Unidos para profilaxia e tratamento. A constante administração de antibióticos em animais determina grande pressão seletiva na microbiota normal e nos microrganismos patogênicos, no sentido de que desenvolvam resistência às drogas. O uso de antibióticos em animais leva preferencialmente à seleção de linhagens de bactérias que são resistentes às drogas normalmente utilizadas no tratamento de infecções em seres humanos (Farrington et al., 2001; Tortora et al., 2002).

A despeito da legislação padrão para controlar o uso de antibióticos em animais produtores de alimentos, nos últimos anos, tem sido significativo o crescimento da resistência a antibióticos em *Salmonella sp* e *Campylobacter sp* e também em pequena extensão em *Escherichia coli* O 157(VTEC), em países desenvolvidos (Threlfall et al., 2000). Para melhor entendimento da extensão da resistência bacteriana a antibióticos, devem ser considerados os mais diversos ambientes em que ela pode ocorrer e sua possível difusão através desses potenciais reservatórios. Tem sido demonstrada a preocupação com as possíveis rotas de difusão de genes de resistência a antibióticos e a transferência para bactérias patogênicas e da microbiota do homem e animais (Teuber, 2001). As potenciais rotas são apresentadas na Figura 1.



2.4 Aquicultura e a resistência a antibióticos

A aquicultura é importante meio para a seleção de espécies bacterianas resistentes a vários antibióticos, em virtude da utilização de tais drogas no tratamento e profilaxia de doenças bacterianas (Schmidt et al., 2000). No entanto, não tem sido dada devida importância ao ambiente aquícola como uma das maiores fontes de bactérias resistentes a antibióticos de interesse humano, como também pouco se conhece do grau de contribuição desta atividade para os problemas de resistência a antibióticos encontrados na medicina humana (Petersen & Dalsgaard, 2003). Com o desenvolvimento da aquicultura, tornou-se mais que necessário o efetivo conhecimento da ação e os possíveis problemas causados por essas substâncias.

A potencial transferência de bactérias resistentes e genes de resistência do ambiente aquícola para o homem pode ocorrer pelo consumo direto desses organismos presentes em peixes e produtos derivados, crus ou que sofreram cocção inadequada (Petersen et al., 2002; Petersen & Dalsgaard, 2003). No entanto, não há nenhum trabalho relatando a ocorrência de bactérias resistentes a antibióticos em filés de peixe.

Os antimicrobianos utilizados em aquicultura são, principalmente, ácido oxolínico, sulfamerazina, oxitetraciclina, cloranfenicol, flumequina, eritromicina, ampicilina, tetraciclina e furazolidona (Barros et al., 2002; Tendencia & dela Peña, 2002).

O uso de oxitetraciclina na criação de peixes tem coincidido com o aumento da frequência de microrganismos e de patógenos de peixes resistentes a este antibiótico. A administração de oxitetraciclina na aquicultura pode produzir um impacto negativo sobre o tratamento de infecções humanas como consequência da transmissão de patógenos resistentes para o homem ou, indiretamente, por meio da transferência de genes de resistência de bactérias do ambiente a patógenos de seres humanos (Miranda & Zemelman, 2002). A

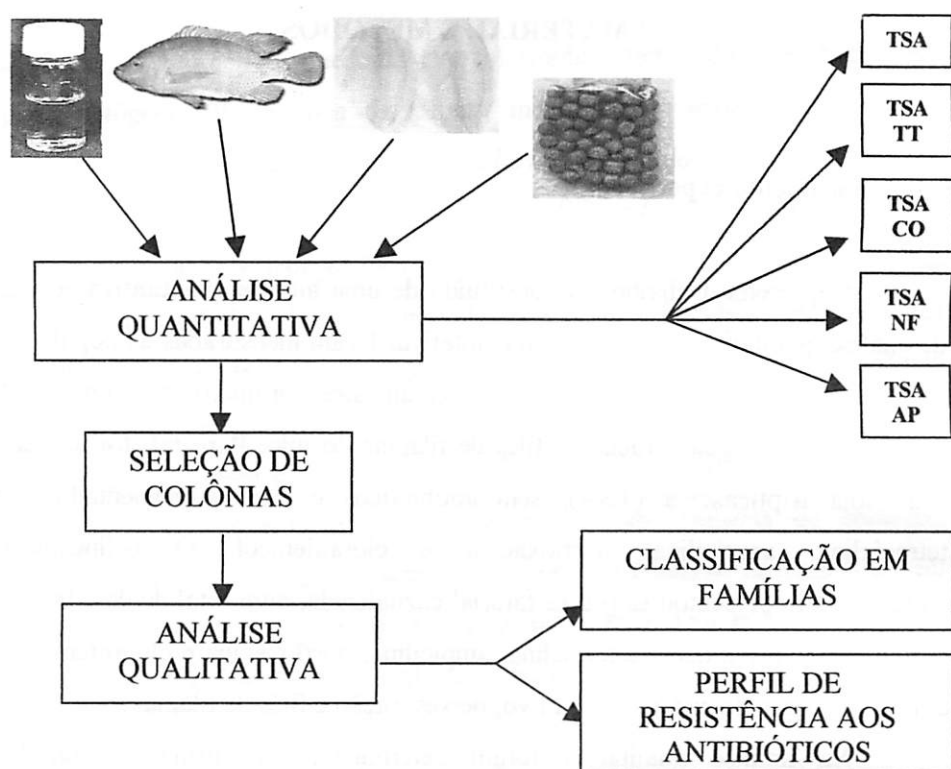


FIGURA 2 Delineamento experimental para determinação das populações de bactérias resistentes a antibióticos em ambiente de criação e filés de tilápias do nilo.

3.2 Piscicultura de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*)

O presente trabalho foi realizado em uma piscicultura de criação de tilápias, apresentando número total de 4 tanques de terra, com densidade de 2,5 peixes/m² cada um. Os peixes eram alimentados com ração farelada elaborada na própria piscicultura, apresentando os seguintes ingredientes: milho, farelo de soja, farinha de peixe, premix mineral e premix vitamínico, sendo a ração

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

O presente trabalho foi constituído de uma análise quantitativa seguida de análise qualitativa. Na análise quantitativa, foram mensuradas as populações de bactérias resistentes a antibióticos nas amostras oriundas do ambiente de criação (peixes, água e ração) e filés de tilápias do nilo. Para tal, foi utilizado ágar soja tripticaseína (TSA), sem antibióticos e TSA suplementado com tetraciclina, ampicilina, norfloxacin e cloranfenicol. O delineamento experimental apresentou estrutura fatorial casualizada, num total de dois fatores, sendo estes: antibióticos (tetraciclina, ampicilina, norfloxacin e cloranfenicol) e ambientes (água do sistema de cultivo, peixes, ração e filés de tilápias).

Na análise qualitativa foram determinadas as principais famílias bacterianas resistentes aos antibióticos no ambiente pesquisado e o perfil de resistência a antibióticos. Além disso, foi determinada a multirresistência dos isolados identificados.

Na Figura 2 encontra-se um resumo do delineamento experimental deste trabalho.

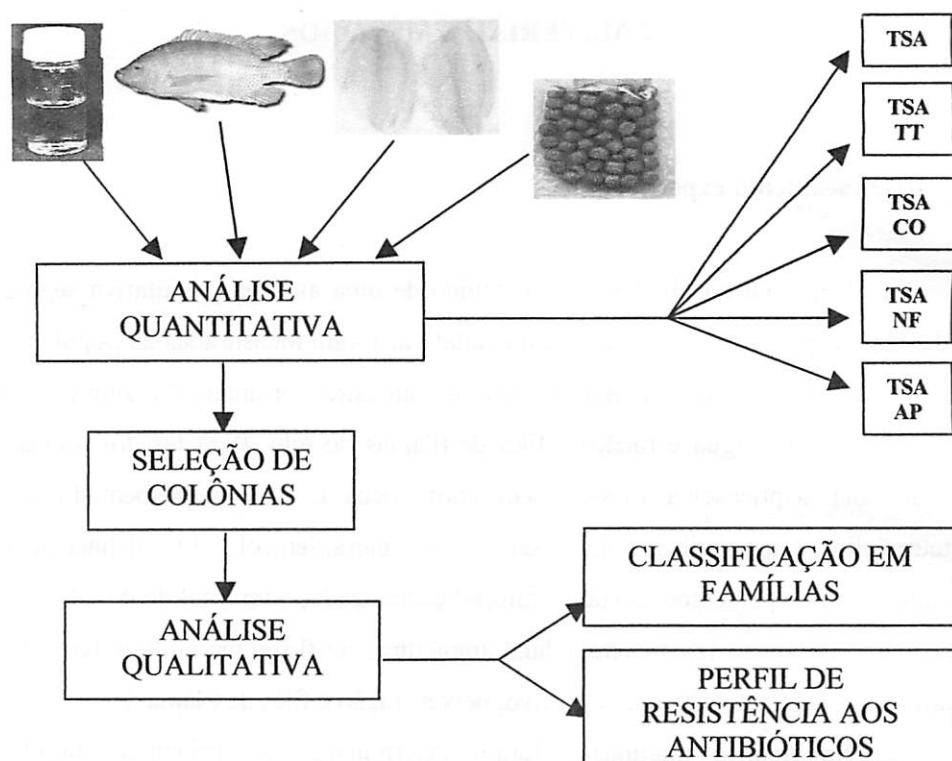


FIGURA 2 Delineamento experimental para determinação das populações de bactérias resistentes a antibióticos em ambiente de criação e filés de tilápias do nilo.

3.2 Piscicultura de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*)

O presente trabalho foi realizado em uma piscicultura de criação de tilápias, apresentando número total de 4 tanques de terra, com densidade de 2,5 peixes/m² cada um. Os peixes eram alimentados com ração farelada elaborada na própria piscicultura, apresentando os seguintes ingredientes: milho, farelo de soja, farinha de peixe, premix mineral e premix vitamínico, sendo a ração

distribuída duas vezes ao dia. A água de abastecimento dos tanques foi oriunda de açude localizado dentro da propriedade.

3.3 Amostras coletadas

As amostras foram coletadas de uma piscicultura de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) em tanques de terra, sem histórico prévio de utilização de antibióticos.

Para a realização do presente estudo foram mensurados parâmetros limnológicos de temperatura, pH e oxigênio dissolvido do tanque selecionado nos cinco dias anteriores e nos dois dias de coleta das amostras.

3.3.1 Peixes

Desta piscicultura foi selecionado um tanque com tamanho de 390 m² (26x15m), de onde foram capturados quinze peixes, sendo 10 para análise de conteúdo intestinal e lavado de superfície e 5 para análise dos filés. Os 10 peixes foram capturados no dia 1 da coleta e acondicionados em sacos plásticos, colocados em caixas de isopor apropriadas e transportados vivos à temperatura ambiente até o laboratório. Antes dos procedimentos laboratoriais os peixes foram sacrificados por choque térmico em caixa de isopor com água e gelo, como recomendado por Noga (1996).

3.3.2 Água do sistema de cultivo

Do mesmo tanque de onde foram capturados os peixes, foram coletadas amostras de água de superfície, sendo amostrados dois pontos do tanque, próximo da entrada e da saída de água. Da mesma forma, foi também coletada água de abastecimento. As amostras foram colocadas em frascos individualizados, estéreis e enviadas ao laboratório, para análise. De cada amostra, foram coletados 500 mL da água.

3.3.3 Ração

Foram coletados também 100g da ração farelada consumida pelos peixes. A amostra foi coletada em frasco estéril e encaminhada ao laboratório para análise microbiológica. Foi também realizada análise bromatológica, segundo metodologia descrita por Silva (1998).

3.3.4 Filés de tilápias do nilo

Cinco peixes, capturados no dia 2 do experimento, foram submetidos ao abate, utilizando-se o procedimento de rotina da piscicultura em estudo.

Antes dos procedimentos de abate foi realizada limpeza da bancada, utensílios e mãos do manipulador. Estes foram lavados inicialmente com água e sabão e, posteriormente, descontaminados utilizando-se álcool iodado a 2%, sendo o excesso retirado posteriormente com álcool a 70%, objetivando a não permanência de resíduos. Os procedimentos de higienização visaram minimizar a contaminação cruzada e para que houvesse predominância de bactérias próprias dos peixes e do ambiente de criação.

O abate dos peixes foi realizado em sala localizada na própria piscicultura. O procedimento ocorreu imediatamente após a captura dos peixes, sendo os mesmos insensibilizados mecanicamente, lavados com água corrente, descamados, eviscerados e filetados em bancada de granito, previamente higienizada. Os filés foram acondicionados separadamente em filme plástico estéril, colocados em caixa de isopor com gelo, previamente higienizada e transportados ao laboratório para análise.

3.3.6 Água de torneira

Foram coletados 500 mL da água de torneira usada para lavagem dos peixes, bancada e utensílios. Como a água já era clorada, esta foi misturada a

tiosulfato de sódio para inativação do cloro. A água foi coletada em frasco estéril e transportada ao laboratório para análise.

3.4 Quantificação das populações bacterianas

3.4.1 Meios de cultura e condições de cultivo

Para a quantificação das populações bacterianas de todas amostras coletadas, foi utilizado o ágar soja tripticaseína (TSA) (BIOLIFE, Itália). Aliquotas de 0,1 mL das diluições adequadas das amostras foram semeadas, em duplicata, em ágar TSA sem antibiótico e TSA suplementado separadamente com tetraciclina (TT), cloranfenicol (CO), norfloxacin (NF) e ampicilina (AP), as drogas TT, CO e NF, na concentração de 25µg/mL e AP na concentração de 10 µg/mL. As placas semeadas foram então incubadas em estufa à temperatura de 30°C por 24 horas. A leitura foi realizada por meio de contagem das colônias e determinação das UFC/ mL pela média das duplicatas e, posteriormente, o resultado foi convertido em log de base 10 para a realização da análise estatística.

O percentual de recuperação de bactérias resistentes a antibióticos foi determinado por meio da divisão do número de colônias (log) do meio contendo antibióticos pelo número de colônias do meio sem antibióticos (log). Este resultado foi então multiplicado por 100 para gerar o percentual de bactérias resistentes.

3.4.2 Microbiota das superfícies das tilápias

Para quantificação da microbiota da superfície, os 10 peixes foram divididos em dois grupos de cinco indivíduos cada, denominados, nesse experimento, de grupo 1 e grupo 2. Cada grupo de 5 peixes foi submetido à metodologia da rinsagem ou lavagem superficial (Harrigan, 1998), sendo as superfícies lavadas em sacos plásticos estéreis contendo solução salina estéril a

0.85%. Foram então procedidas as diluições adequadas.

3.4.3 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) (2000). A desinfecção da superfície dos peixes foi realizada com álcool 70%. A etapa seguinte foi a incisão na porção ventral média e coleta do conteúdo intestinal assepticamente. Como no item 3.4.2, parte do intestino dos peixes de cada grupo foi seccionada, pesada e, juntamente com o conteúdo intestinal, colocada em placas de Petri estéreis e pesados 10 gramas do homogenato de cada grupo, macerados e diluídos em 90 mL de solução salina estéril a 0,85%, formando a diluição 10^{-1} dos grupos 1 e 2 e realizadas assim as diluições adequadas.

3.4.4 Água do tanque, de abastecimento e de torneira

As duplicatas das amostras de água do tanque, de abastecimento e de torneira foram homogeneizadas em proporções iguais, separadamente, de maneira asséptica, formando um grupo de cada amostra. Aliquotas de 1 mL de água foram inoculadas em tubos contendo 9 mL de solução salina a 0,85%, procedendo-se as diluições adequadas.

3.4.5 Ração

Dez gramas da ração foram macerados e homogeneizados em 90mL de solução salina a 0,85%, formando a diluição 10^{-1} e então realizadas as diluições adequadas.

3.4.6 Filés de tilápias do nilo

Foram obtidos assepticamente 25g de cada um dos cinco filés dos peixes abatidos, sendo os mesmos macerados em grill com pistilo estéreis individualizados e homogeneizados em 225 mL de solução salina estéril, procedendo-se diluições seriadas até 10^{-3} . Das diluições 10^{-1} de cada peixe foram separadas alíquotas de 10 mL e levadas à centrifuga por 20 minutos, 3.000 rpm e 4°C. Foi descartada a parte líquida e o sedimento ressuspendido em 1 mL de solução salina para semeadura direta nos meios de cultura. As sobras dos filés foram reembaladas em filme plástico estéril e submetidas a congelamento em freezer doméstico por um período de 30 dias para posterior análise.

3.4.7 Filés de tilápias congelados

Após o período de 30 dias, foi realizado o descongelamento dos filés de peixe à temperatura ambiente, por duas horas e só então retirados da embalagem para processamento. O procedimento para quantificação das populações bacterianas resistentes aos antibióticos testados foi o mesmo usado para os filés frescos (item 3.4.6).

3.5 Análise qualitativa

3.5.1 Identificação das principais famílias bacterianas

Após a determinação das populações bacterianas resistentes aos antibióticos testados (tetraciclina, norfloxacin, ampicilina, cloranfenicol), foram selecionadas e repicadas cinco colônias da duplicata da diluição ótima de cada amostra. Os testes de triagem de Gram, catalase, oxidase e oxidação-fermentação (O-F) (Quinn et al., 1994) permitiram a identificação de isolados pertencentes a quatro famílias distintas encontradas no ambiente de piscicultura de água doce, sendo elas: *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae* e *Micrococcaceae*.

3.5.2 Perfil de resistência a antibióticos

As famílias bacterianas identificadas foram submetidas à determinação do perfil de resistência a antibióticos pelo método de difusão de discos de antibióticos, utilizando o ágar Müller Hinton (OXOID, USA) (NCCLS, 1990). Os agentes antibióticos e quimioterápicos escolhidos representaram diferentes classes dessas drogas, além de apresentar relevante importância para a terapêutica na medicina humana e animal, sendo eles: tetraciclina, cloranfenicol, sulfazotrim, ampicilina, norfloxacin, cefuroxima, nitrofurantoina, kanamicina e eritromicina (CECON, Brasil). Foram utilizadas, como controle de qualidade do teste as amostras de referência de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

Inóculos dos isolados obtidos foram resuspensoes em salina estéril e padronizados comparativamente ao tubo nº 0,5 da escala McFarland. Os inóculos foram estriados em placas contendo cerca de 4 mm de ágar Mueller Hinton, por meio de "swabs" estéreis. Os discos de antibióticos foram então colocados na superfície do ágar e as placas foram incubadas em estufa à temperatura de 30°C, por 18-24 horas. Após este período, os diâmetros das zonas de inibição foram mensurados e comparados com a tabela de performance padrão para testes de susceptibilidade a antibióticos e então classificados em resistentes e sensíveis.

3.5.3 Perfil de multirresistência

Foi analisada a frequência de resistência a cada droga testada, bem como a ocorrência de multirresistência. De cinco grupos distintos que determinavam a origem das bactérias isoladas (água, ração, conteúdo intestinal, lavado de superfície e filés de tilápias), foram escolhidos, de forma aleatória, cinco isolados de cada uma das famílias identificadas, bem como do grupo de bactérias não identificadas. A partir desse critério, foram selecionados 89

isolados para a determinação do perfil de resistência aos nove antibióticos selecionados. Para análise da multirresistência foi utilizado Índice MAR (múltipla resistência a antibióticos). Este índice, quando aplicado a um isolado, é definido como a/b , em que “a” representa o número de antibióticos aos quais o isolado foi resistente e “b” representa o número de antibióticos aos quais o isolado foi exposto (Krumperman, 1983). No presente trabalho, foi considerada multirresistência quando os isolados apresentaram resistência simultânea a duas ou mais drogas.

3.6 Análise estatística

Inicialmente foram gerados gráficos de caixa (box-plot) descritivos para cada fator, permitindo uma comparação rápida que pode orientar a escolha dos testes de hipótese. Os significados de cada um dos elementos são descritos na Figura 3.

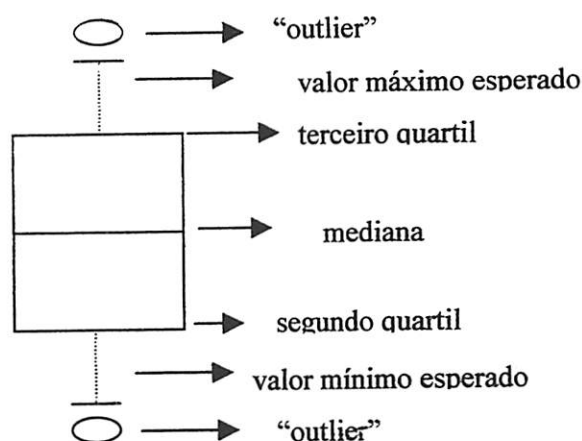
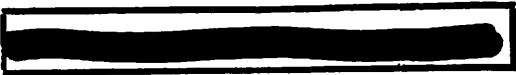


FIGURA 3 Significado do gráfico de caixa (Box-plot)



Para a comparação entre as populações bacterianas resistentes às drogas testadas no ambiente de criação e filés de tilápias, foi usada análise de variância (ANAVA) do modelo $\log y_{ijk} = \mu + t_i + m_j + (t \times m)_{ij} + e_{ijk}$, sendo t_i : tipo – água do sistema de cultivo, peixes, ração e filés de tilápias com $i = 1, \dots, 5$ e m_j : medicamento- ampicilina, norfloxacina, cloranfenicol e tetraciclina, com $j = 1, \dots, 5$. O ensaio fatorial foi montado em um delineamento inteiramente casualizado, assumindo que os erros têm distribuição normal e independente, adotando-se o nível de 5% de significância para a realização dos testes F da ANAVA. Valores do teste de T de Student foram calculados para cada efeito nos casos em que a respectiva fonte de variação foi significativa pelo teste F.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Parâmetros limnológicos avaliados no ambiente de criação de tilápias

Os resultados dos parâmetros limnológicos obtidos do tanque de criação selecionado para ao presente estudo são apresentados na Tabela 1.

Os parâmetros limnológicos foram tomados durante sete dias, sendo cinco dias antes (1 a 5) e nos dois dias das coletas (6 e 7). A média dos valores de temperatura, oxigênio dissolvido, pH e densidade, situaram-se dentro dos limites estabelecidos para criação de tilápias (Proença & Bittencourt, 1994). Entretanto, alguns valores de oxigênio dissolvido apresentaram-se baixos, em decorrência do horário de mensuração deste parâmetro.

TABELA 1 Resultado dos parâmetros limnológicos obtidos do tanque selecionado para coleta das amostras.

Dias do experimento	Parâmetros limnológicos avaliados		
	T.A. °(C)	pH	O.D.
1	24,1	7,36	1,74
2	23	7,95	2,47
3	24,8	6,89	1,93
4	24,8	7,01	2,30
5	25,5	7,14	1,96
6	25,6	7,13	1,56
7	24,5	6,97	0,67

* T.A: temperatura da água; O.D.: oxigênio dissolvido.

As medidas ocorreram sempre nas primeiras horas da manhã, período considerado crítico, devido ao alto consumo de O_2 pelo plâncton durante a noite.

4.2 Populações bacterianas resistentes aos antibióticos

Na Figura 3 está representada a variação da população geral das bactérias resistentes aos antibióticos testados, oriundas do ambiente de criação e filés de tilápias do nilo.

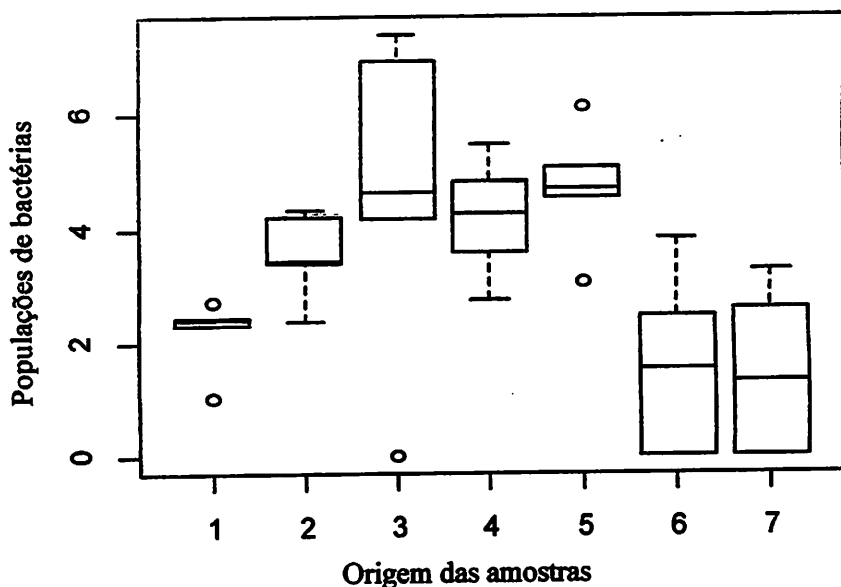


FIGURA 3 Gráfico de caixa representando as populações bacterianas resistentes a antibióticos no ambiente de criação (1- água de abastecimento; 2- água de tanque; 3- conteúdo intestinal; 4- lavado de superfície; 5- ração) e filés de tilápias (6- filés de tilápias frescos; 7- filés de tilápias congelados)

Pela Figura 3 observa-se que as populações bacterianas resistentes no ambiente de criação diferiram entre si, apresentando-se mais altas no conteúdo intestinal ($P < 0,001$), na ração ($P < 0,001$) e no lavado de superfície ($P < 0,01$) sendo mais baixas na água de abastecimento ($P < 0,01$). De modo geral, maiores populações de bactérias foram observadas no ambiente de criação (conteúdo intestinal, lavado de superfície e ração) do que nos filés de tilápias (filés frescos e congelados). Em relação ao ambiente de criação, observou-se maior população dentro do sistema (peixes e ração) do que na água de abastecimento (que vem de fora do sistema), sendo nesta a mais baixa contagem de bactérias. A partir do fluxo de entrada de água no sistema aquícola, as contagens de bactérias resistentes foram baixas e aumentaram gradativamente (água de tanque, conteúdo intestinal, lavado de superfície e ração). Este fato sugere que o ambiente de criação favoreceu o aumento das populações de bactérias resistentes aos antibióticos testados.

As maiores contagens de bactérias resistentes aos antibióticos testados foram encontradas no conteúdo intestinal dos peixes do sistema de cultivo avaliado. Populações de *Aeromonas* sp. *Enterococcus* sp resistentes a antibióticos em conteúdo intestinal de peixes também foram verificadas em pisciculturas integradas na Tailândia (Petersen & Dalsgaard, 2003). Amostras de conteúdo intestinal do trabalho podem ser consideradas fontes potencialmente responsáveis pela transmissão de bactérias resistentes no sistema de cultivo de tilápias estudado.

A ração apresentou uma das mais altas contagens de bactérias resistentes (Figura 3). Populações bacterianas resistentes à oxitetraciclina em amostras de ração foram encontradas em trabalhos anteriores (Kerry et al., 1997 e Miranda & Zemelman 2002). Sugere-se que a microbiota resistente a antibióticos na ração possa ter sido introduzida por falhas no processamento ou pela contaminação durante o armazenamento, devido à presença de proteína de origem animal,

substrato favorável ao desenvolvimento de bactérias. Maiores populações de bactérias resistentes a antibióticos no conteúdo intestinal e na ração tornam esses sítios de amostragem fontes potenciais de difusão de bactérias resistentes no ambiente aquícola estudado.

Em relação às populações de bactérias resistentes das amostras de filés de tilápias (frescos e congelados) (Figura 3), não houve diferenças significativas entre as mesmas. No entanto, essas diferenças ocorreram entre os filés e as amostras do ambiente de criação, como conteúdo intestinal ($P < 0,001$), lavado de superfície ($P < 0,01$) e ração ($P < 0,001$). Os resultados mostram que as populações de bactérias resistentes nos filés, apesar de inferiores às do ambiente de criação, ainda estiveram presentes. Esse fato sugere que tais populações podem ser oriundas do ambiente de criação, pois, apesar do rigoroso processo de limpeza e desinfecção no ambiente de abate e filetagem e de não ter havido populações resistentes na água da torneira da sala de abate, ocorreu introdução de tais populações nos filés de tilápias frescos e algumas persistindo até os filés congelados. Considerando-se que o abate dos peixes ocorreu imediatamente após a captura dos mesmos e que em condições de abate manual as práticas de limpeza e desinfecção nem sempre seriam tão rigorosas quanto aquelas ocorridas no presente trabalho, sugere-se que essas populações, em outras condições, apresentar-se-iam mais altas.

As quantificações da população bacteriana total e das populações resistentes a tetraciclina, ampicilina, norfloxacina e cloranfenicol no ambiente de criação e filés de tilápias do nilo, são apresentadas na Tabela 2.

TABELA 2 Quadro resumo das médias das populações de bactérias resistentes a antibióticos no ambiente de criação e filés de tilápias Nilo.

Origem da amostra	Populações resistentes (log)				
	CT	AP	NF	CO	TT
Água de abastecimento	2,44 ^b	2,7 ^b	2,31 ^b	2,39 ^b	1,83 ^b
Água de tanque	4,33 ^c	4,21 ^c	3,41 ^c	3,42 ^c	2,36 ^c
Lavado de superfície	4,93 ^d	4,01 ^d	4,66 ^d	4,22 ^d	2,82 ^d
Conteúdo intestinal	6,97 ^d	7,18 ^d	0 ^a	4,50 ^d	4,39 ^d
Ração farelada	6,15 ^d	4,72 ^d	4,55 ^d	5,08 ^d	3,06 ^d
Filés de tilápias frescos	2,88 ^b	1,51 ^b	1,51 ^b	1,91 ^b	0 ^a
Filés de tilápias congelados	2,61 ^b	1,19 ^b	0 ^a	2,39 ^b	0

CT: contagem total; AP: ampicilina; NF: norfloxacin; CO: cloranfenicol; TT: tetraciclina.

- a- Abaixo da média
- b- Nível médio
- c- Acima da média
- d- Muito acima da média

Os dados da Tabela 2 demonstram que as populações bacterianas resistentes a ampicilina e cloranfenicol não apresentaram diferença entre as diversas origens no sistema criação de tilápias. As populações de bactérias resistentes à norfloxacin foram superiores em todos os ambientes avaliados, quando comparadas às de conteúdo intestinal ($P < 0,001$), onde não houve populações resistentes a essa droga. Entretanto, entre os diferentes ambientes, não houve diferença significativa entre as populações resistentes à norfloxacin.

Em filés de tilápias frescos, populações resistentes à norfloxacinina foram observadas, não sobrevivendo, contudo, ao processo de congelamento utilizado. Estas bactérias resistentes à norfloxacinina podem pertencer ao mesmo grupo bacteriano (família, gênero).

Na Tabela 3 encontram-se os percentuais de recuperação de populações bacterianas resistentes aos antibióticos testados, no ambiente de produção e filés de tilápias do nilo.

TABELA 3 Percentuais de recuperação de bactérias resistentes a antibióticos ambiente de criação e filés de tilápias do nilo.

Origem da amostra	Percentual de recuperação (%)				
	Contagem total (log)	AP	NF	CO	TT
Água de abastecimento	2,44	110	94,67	97,95	42,21
Água de tanque	4,33	97,23	78,75	78,98	54,50
Lavado de superfície	4,93	81,33	94,53	85,19	58,01
Conteúdo intestinal	6,97	103	0	64,88	62,99
Ração farelada	6,15	76,75	73,98	82,60	49,76
Filés de tilápias frescos	2,88	51,70	46,87	59,37	0
Filés de tilápias congelados	2,61	44,73	0	91,48	0

AP: ampicilina; NF: norfloxacinina; CO: cloranfenicol; TT: tetraciclina.

Os percentuais de recuperação obtidos de bactérias resistentes aos antibióticos (Tabela 3) foram considerados altos para um ambiente sem uso destas drogas. Em criações de peixes e camarão, onde havia uso de drogas, foram encontrados percentuais de recuperação inferiores aos encontrados neste trabalho (Tendência & dela Peña 2002; Miranda & Zemelman 2002). Esses resultados sugerem que isso possa ter ocorrido em função das diferentes condições experimentais dos trabalhos (temperatura, tipo de peixe e local do experimento, entre outros). Os percentuais de recuperação de bactérias resistentes a antibióticos em clima tropicais podem mais elevados que em outras regiões em função das temperaturas das águas que favorecem o desenvolvimento de determinados grupos de bactérias (mesófilos e psicrotróficos) (Viégas & Souza, 2004). Fato que poderia proporcionar, em função de maiores densidades populacionais a troca de genes de resistência a antibióticos.

No sistema de cultivo deste trabalho, a água de abastecimento apresentou maiores percentuais de recuperação de bactérias resistentes e menores populações de bactérias e o conteúdo intestinal apresentou maiores populações de bactérias e menores percentuais de recuperação. Este resultado sugere que, neste caso outros fatores, que a população de bactérias, favoreceram o percentual de bactérias resistentes recuperadas.

Em relação aos antibióticos testados, ampicilina, cloranfenicol e tetraciclina apresentaram maiores percentuais de recuperação nos diferentes ambientes (Tabela 3). Foram encontrados maiores percentuais de recuperação de bactérias resistentes às mesmas drogas em experimentos com peixes (Miranda e Zemelman 2001).

De modo geral, considera-se que a presença de bactérias resistentes a antibióticos em pisciculturas esteja associada ao uso dessas drogas em tais ambientes (Schmidt et al., 2000; Threlfall et al., 2000; Tendência & de la Peña, 2001; Petersen & Dalsgaard, 2003). Contudo, pelos resultados obtidos, pode-se

sugerir que outros fatores estejam envolvidos na seleção de bactérias resistentes aos antibióticos no ambiente estudado.

4.3 Frequência das famílias bacterianas resistentes aos antibióticos testados

Para melhor apresentação dos resultados e comparação das principais famílias bacterianas resistentes aos antibióticos testados, foram considerados dois grupos descritos como ambiente de criação (água de tanque, água de abastecimento, ração, lavado de superfície e conteúdo intestinal de peixes) e filés de tilápias (filés frescos e congelados).

Na Figura 4 são apresentadas as famílias bacterianas da população resistente aos antibióticos testados no ambiente de criação de tilápias do nilo.

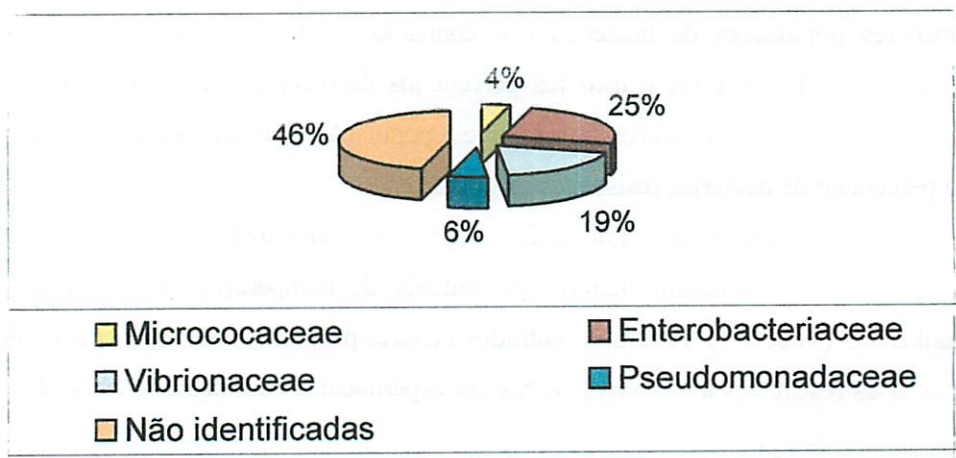


FIGURA 4 Frequência das famílias bacterianas resistentes a antibióticos em ambiente de criação de tilápias do nilo.

Neste trabalho, somente foram caracterizadas famílias bacterianas potencialmente patogênicas para o homem e importantes na troca de genes de resistência. Muitos isolados não foram enquadrados em nenhuma das famílias descritas, pois o ambiente piscícola apresenta grande diversidade de bactérias. (Miranda & Zemelman, 2002).

De um total de 124 isolados do ambiente de criação de tilápias, a maioria das bactérias pertencia às famílias *Enterobacteriaceae* e *Vibrionaceae*. Não houve diferenças marcantes na composição da microbiota do ambiente de criação dos peixes avaliados em relação a estudos anteriores que encontraram principalmente bactérias pertencentes às mesmas famílias, sendo *Vibrionaceae* dominante em amostras de conteúdo intestinal de várias espécies de peixes (Huss, 1988; Sugita et al., 1991; Miranda & Zemelman, 2001). Essas famílias apresentam bactérias consideradas da microbiota indígena e não indígena dos peixes e, eventualmente, podem estar presentes em baixas contagens iniciais. Entretanto, de acordo com as condições de processamento e armazenamento, podem apresentar crescimento da população inicial, tornando-se um perigo para a saúde pública (Huss, 1994).

Na Figura 5 é apresentada a distribuição das frequências das famílias bacterianas nas amostras de filés de tilápias.

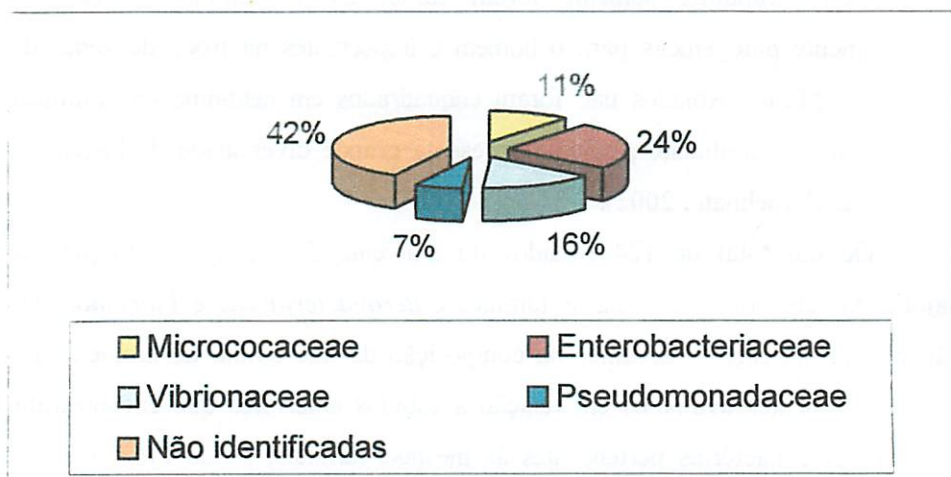


FIGURA 5 Frequência das famílias bacterianas resistentes aos antibióticos em filés de tilápias do nilo.

Nos 90 isolados de filés (frescos e congelados), observou-se a predominância de *Enterobacteriaceae* e *Vibrionaceae*, tendo uma frequência de isolamento semelhante à obtida no ambiente de criação. Ainda foram observados isolados de *Micrococaceae*, dos quais 50% eram *Staphylococcus* sp. Este fato sugere a possibilidade da contaminação por *Micrococaceae* nos filés ser de origem ambiental, já que essas bactérias foram também encontradas no ambiente de criação, apesar de serem considerados por alguns autores como da microbiota não indígena do ambiente de piscicultura (Huss, 1994).

4.4 Perfil de resistência a antibióticos

Os percentuais de isolados de ambiente de criação e filés de tilápias, resistentes a cada um dos antibióticos testados, são apresentados na Tabela 4.

TABELA 4 Frequências de resistência a antibióticos em isolados bacterianos de ambiente de criação e filés de tilápias do nix

Nº de amostras resistentes (%)		
Antibióticos	Ambiente de criação	Filés de tilápias
Tetraciclina	31 (15%)	5 (8%)
Eritromicina	48 (24%)	12 (18%)
Nitrofurantoína	19 (9%)	5 (8%)
Kanamicina	12 (6%)	6 (9%)
Ampicilina	47 (23%)	14 (22%)
Norfloxacina	11 (5%)	6 (9%)
Cefuroxima	19 (9%)	9 (14%)
Cloranfenicol	14 (7%)	6 (9%)
Sulfazotrim	3 (2%)	2 (3%)

Tanto no ambiente de criação como nos filés de tilápias, observou-se que os isolados apresentaram frequências de resistência isoladas consideradas baixas e padrões de resistência parecidos em relação aos antibióticos testados, sendo estes resistentes principalmente à ampicilina e eritromicina. A resistência mediada por plasmídios é bastante comum nesses grupos de drogas (Prescott, 2003). Plasmídios carreando genes de resistência têm sido detectados na maioria dos grupos bacterianos e podem ser isolados de bactérias da microbiota normal de animais de produção saudáveis (Sorum & L'Abée- Lund, 2002). Estes resultados sugerem que tanto o ambiente de criação como os filés de tilápias pesquisados constituem-se em fontes potenciais de bactérias resistentes principalmente a eritromicina e ampicilina, mesmo sem o uso destas drogas na piscicultura. Entretanto, o presente estudo não determinou se os elementos

genéticos que caracterizaram resistência são de origem cromossômica ou plasmidial. Caso esta resistência seja codificada por plamídios ou transposons estes podem disseminar esta característica para espécies bacterianas filogeneticamente distintas, patogênicas ou não.

Dentre os grupos de drogas analisados neste estudo tem sido detectado o aumento da utilização da norfloxacin, em piscicultura. Muitos trabalhos têm esclarecido os mecanismos de resistência das bactérias a essa droga (Goni-ürriza et al., 2000; HawKey, 2003; Klugman, 2003). Estes trabalhos demonstram que a resistência às quinolonas é cromossômica e que surge da difusão de clones de amostras mutantes e a transferência de resistência é rara. Entretanto, não foi descartada a possibilidade de no futuro a transferência de genes de resistência se tornar a mais importante maneira de conferir resistência às quinolonas.

A ocorrência de resistência aos antibióticos em bactérias oriundas do ambiente de criação, de acordo com as famílias identificadas, é apresentada na Tabela 5. Das quatro famílias estudadas, duas (*Enterobacteriaceae* e *Vibrionaceae*) apresentaram maiores freqüências de isolados resistentes à ampicilina e eritromicina.

TABELA 5 Perfil de resistência a antibióticos em isolados bacterianos de diferentes famílias, oriundos de ambiente de criação de tilápias do nilo.

Famílias	Nº de amostras	Antibióticos*								
		TT	ERI	NIT	KAN	AP	NO	CFX	CO	SF
<i>Enterobacteriaceae</i>	20	14	19	6	3	15	2	3	2	0
<i>Micrococcaceae</i>	4	4	1	0	0	1	1	0	1	0
<i>Vibrionaceae</i>	14	4	11	4	2	13	3	2	4	0
<i>Pseudomonadaceae</i>	6	1	3	4	1	3	2	3	4	1
Não identificadas	20	8	14	6	6	15	3	7	3	2
Total	65	31	48	20	12	47	11	15	14	3

* TT: tetraciclina; ERI: eritromicina; NIT: nitrofurantoína; KAN: kanamicina; AP: ampicilina; NO: norfloxacin; CFX cefuroxima; CO: cloranfenicol; SF sulfazotrim.

O padrão de resistência aos antibióticos testados nos isolados bacterianos oriundos de filés de tilápia de acordo com as famílias identificadas é mostrado na Tabela 6.

TABELA 6 Perfil de resistência a antibióticos em isolados bacterianos de diferentes famílias, oriundos de filés de tilápias do nilo.

Famílias	Nº de amostras	Antibióticos*								
		TT	ERI	NIT	KAN	AP	NO	CFX	CO	SF
<i>Enterobacteriaceae</i>	5	0	2	1	0	3	1	1	1	0
<i>Micrococcaceae</i>	5	0	3	1	1	1	1	3	1	0
<i>Vibrionaceae</i>	5	2	4	0	2	5	0	1	2	0
<i>Pseudomonadaceae</i>	5	1	1	3	3	3	2	3	2	1
Não identificadas	5	2	2	0	0	2	2	1	0	2
Total	25	5	12	5	6	14	6	9	6	3

*TT: tetraciclina; ERI: eritromicina; NIT: nitrofurantoína; KAN: kanamicina; AP: ampicilina; NO: norfloxacin; CFX: cefuroxima; CO: cloranfenicol; SF: sulfazotrim.

Como nas amostras ambientais, naquelas oriundas de filés de tilápias, as famílias *Enterobacteriaceae* e *Vibrionaceae* apresentaram a maior parte de seus isolados resistentes à ampicilina e eritromicina.

Os resultados do índice MAR (múltipla resistência aos antibióticos) de filés de tilápia, água, ração, superfície e conteúdo intestinal de peixes e o percentual de ocorrência são apresentados na Tabela 7.

TABELA 7 Percentuais de ocorrência de múltipla resistência a antibióticos (MAR) em bactérias oriundas de ambiente de criação e filés de tilápias do nilo

Índice MAR	Origem dos isolados				
	Intestino (16)	Superfície (18)	Água (18)	Ração (12)	Filés (25)
0,22	43,8%	40%	33,3%	8,3%	32%
0,33	25%	22,2%	11,1%	16,7%	12%
0,44	12,5%	0	27,8%	25%	8%
0,55	0	11,1%	5,6%	25%	16%
0,66	0	0	5,6%	8,3%	4%
0,77	0	5,6%	0	8,3%	0
0,88	0	5,6%	5,6%	0	0
0,99	0	0	0	0	0

() número de isolados de cada origem

De um total de 89 isolados analisados, 74 (83%), apresentaram MAR $\geq 0,2$, ou seja apresentaram-se resistentes a dois ou mais antibióticos. Quando foram considerados os diferentes ambientes analisados, observou-se que os isolados de ração apresentaram os maiores percentuais de MAR, sendo 92% isolados com MAR $\geq 0,2$. Os isolados de água, superfície, conteúdo intestinal e filés de peixe mostraram percentuais de 89%, 84%, 81% e 72 % de MAR $\geq 0,2$, respectivamente. Quando considerado um índice MAR $\geq 0,55$ (resistência a cinco ou mais drogas), os isolados de ração, superfície, filés e água apresentaram

42%, 22%, 20% e 17% de índice MAR, respectivamente. Já no conteúdo intestinal, nenhuma bactéria foi isolada com tal classificação. Tal fato sugere que o intestino pode não ser a principal fonte de bactérias multirresistentes, apesar de ter sido a maior população entre as amostras avaliadas.

A múltipla resistência a antibióticos (MAR) é alta em ambiente onde há uso constante dessas drogas (Krumperman, 1983; Vivekanandhan et al., 2002). Entretanto, no estudo, os resultados do índice MAR revelaram que, mesmo sem o uso de antibióticos no ambiente analisado, muito mais da metade dos isolados foi considerada de alto risco de transferência de genes.

Os isolados da amostra de ração apresentaram maior percentual de $MAR \geq 0,22$ e $MAR \geq 0,55$ (92% e 42%), sugerindo que a ração é, dentre as amostras analisadas, aquela de origem de mais alto risco de transferência, podendo provocar a difusão e prevalência de resistência no ambiente de produção. A frequência de MAR nos isolados de conteúdo foi uma das menores (81%), entre as amostras de ambiente. Foram encontradas bactérias multirresistentes aos antibióticos testados de conteúdo intestinal de peixes (Miranda & Zemelman, 2001). Mesmo com menor MAR no conteúdo intestinal destes peixes em relação às demais amostras do ambiente, pode ser possível a troca de genes de resistência entre essas bactérias e aquelas da microbiota dos peixes. O trato gastrintestinal do homem e animais é um local favorável à troca de genes de resistência entre bactéria da microbiota e até bactérias patogênicas (Smith & Lewin, 1993).

A ocorrência de múltipla resistência aos antibióticos (MAR) testados foi também determinada em relação às principais famílias bacterianas. A família *Pseudomonadaceae* apresentou o maior número de amostras resistentes a dois ou mais antibióticos (64%), seguida da *Enterobacteriaceae* com 60% das amostras com $MAR \geq 0,2$ e *Vibrionaceae* com 42%. Fato bastante preocupante, pois tem sido relatado que a multirresistência, em alguns membros de

Pseudomonadaceae. está associada a fatores ou plasmídios R (fatores de resistência) e que estes fatores são bastante comuns em bactérias entéricas (Quinn et al., 1994). *Micrococcaceae* apresentou menor percentual de amostras resistentes a duas ou mais drogas (33,3%).

Resistência a antibióticos mediada por plasmídios tem sido identificada em um número significativo de bactérias de peixes, incluindo membros da família *Pseudomonadaceae* e *Enterobacteriaceae*. Esses plasmídios têm codificado resistência ao cloranfenicol, sulfonamidas e streptomicinas (Alderman & Hastings, 1998).

O presente trabalho demonstra que, mesmo sem o uso prévio de antibióticos na piscicultura estudada, populações de bactérias resistentes aos antibióticos testados foram encontradas tanto no ambiente de criação como nos filés de tilápias. Estes resultados sugerem a possibilidade de carreamento dessas populações de bactérias do ambiente de criação para os filés de tilápias, podendo esses genes de resistência ser inseridos na cadeia alimentar humana.

5 CONCLUSÕES

Foi encontrada grande diversidade de populações de bactérias resistentes aos antibióticos testados (ampicilina, norfloxacin, cloranfenicol e tetraciclina), tanto no ambiente de criação como nos filés de tilápias do nilo. Foi confirmado carregamento de bactérias resistentes aos antibióticos do ambiente de criação para os filés de tilápias durante o abate e processamento.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-HARBI, A.H. Faecal coliforms in pond water, sediments and hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus* in Saudi Arabia. *Aquaculture Research*. 34: 517-524, 2003.
- ALDERMAN, D. J.; HASTINGS, T.S. Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance- potencial for consumer health risks. *Int. J. Food Sci. and Technol.* 33: 139-155, 1998.
- BARROS, G.C.; MENDES, E.S.; SANTOS, F.L. DOS. Patologia dos peixes. *Revista CFMV*. 26: 44-56, 2002.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standard single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 36: 493-496, 1966.
- BORGHETTI, J.R.; OSTRENSKY, A. A cadeia produtiva da aquicultura brasileira. In. Valenti, W.C.; Poli, C.R.; Pereira, J.A.; Borghetti, J.R. Eds. *Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável*. Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia, 2000. pp. 303-322.
- BLAKE, D.P.; HILLMAN, K.; FENLON, D.R.; LOW, J.C. Transfer of antibiotic resistance between commensal and pathogenic members of the *Enterobacteriaceae* under ileal conditions. *J.Appl Microbiol.* 95: 428-436. 2003.
- 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*. 215: 11-20, 2003.
- DAVISON, H.C.; LOW, C.; WOOLHOUSE, M.E.J. What is antibiotic resistance and how can we measure it? *Trends in Microbiol.* 8 (12): 554-559, 2000.
- FARRINGTON, L.A.; HARVEY, R.B.; BUCKLEY, S.A. DROLESKEY, R.E.; NISBET, D.J.; INSKIP, P.D. Prevalence of antimicrobial resistance in *Salmonellae* isolated from market- age swine. *J. Appl. Microbiol.* 64: 1496-1502, 2001.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED STATES. The state of world fisheries and aquaculture: 1998. FAO, Roma. 112p., 1999.

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. *J.Appl. Microbiol.* 96: 878-886, 2004.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos*. São Paulo: Varela, 2001. 629 p.

GIANNINI, D., PARIN, M.A.; GADELETA, L.; CARRIZO, G.; ZUGARRAMURDI, A. Influence of raw material quality on quality of iced and frozen white fish products. *J. Food Quality*, 24: 527-538, 2001.

GONI-ÛRRIZA, 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. *Appl. Environm. Microbiol.* v. 66, n. 1, 125-132, 2000.

GRAM, L.; HUSS, H.H. Microbiological spoilage of fish and fish products. *Int. J. Food Microbiol*, 33: 121-137, 1996.

HAMEED, A.S.S.; RAHAMAN, K.H.; ALAGAN, A.; YOGANANDHAN, K. Antibiotic resistance in bacteria isolated from hatchery – reared larvae and post-larvae of *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 217: 39-48, 2003.

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

HAWKEY, P.M. Mechanisms of quinolones action and microbial response. *J.Antimicrobial Chemotherapy*. 51: 29-35, 2003.

HEUER, H.; KRÖGERRECKLENFORT, E.; WELLINGTON, E.M.; EGAN, S. van ELSAS, J.D.; van OVERBEEK, L.; COLLARD, J.-M.; GUILLAUME, G.; KARAGOUNI, A.D.; NIKOLAKOPOULOU, T.L.; SMALLA, K. Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: prevalence and transfer. *FEMS Microbiol. Ecology*. 1404: 1-14, 2002.

HOLMOSTRÖM, K.; GRÄSLUND, S.; WAHLSTRÖM, A.; POUNGSHOMPOO, S.; BENGTSSON, B.; KAUTSKY, N. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. *Int. J. Food Sci. and Techn.* 38: 255-266, 2003.

HOWGATE, P. Review of public health safety of products from aquaculture. *Int. J. Food Sci. and Techn.* , 33: 99-125, 1998.

HUSS, H.H. *El pescado fresco: su calidad y cambios de calidad*. Roma: FAO, 1988. 132p.

HUSS, H.H. *Assurance of seafood quality*. FAO Fisheries technical paper, n° 334. Roma: FAO, 1994. 169 p.

HUSS, H.H.; REILLY, A.; EMBAREK, K.B. Prevention and control of hazards in seafood. *Food Control* 11: 149-156, 2000.

KLUGMAN, K.P. The role of clonality in the global spread of fluroquinolone-resistant bacteria. *Clin. Infectious diseases*. 36: 783-785, 2003

KRUMPERMAN, P.H. Multiple antibiotic indexing of *Escherichia coli* to identify high risk sources of fecal contamination of foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 165-170, 1983.

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

KERRY, J.; NICGBHAINN, S; SMITH, P. Changes in oxytetracycline resistance of intestinal microflora following oral administration of this agent to Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts in marine environment. *Aquaculture*, 157: 187-195, 1997.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. *Brock biology of microorganisms*. 8th ed. New Jersey: Prentice Hall, 1994. 986p.

MARTINS, C.V.; VAZ, S.K. Aspectos sanitários de pescados comercializados em pesque pagues de Toledo-Pr. *Higiene Alimentar*. 16: 51-56, 2002.

MCKEEGAN, K.S.; BORGES, M.I.W.; WALMSLEY, A.R. Microbial and viral drug resistance mechanisms. *Trends in Microbiology*. 10: 8-14, 2002.

MIETTINEN, H.; SATU SALO, K.A.; SJÖBERG, A. Evaluation of surface contamination and the presence of *Listeria monocytogenes* in fish processing factories. **J.Food Protection**. 64:635-639, 2001.

MIRANDA, C.D.; ZEMELMAN, R. Antibiotic resistant bacteria in fish from the Concepción Bay, Chile. **Marine Pollution Bulletin**, 42: 1096- 1102, 2001.

MIRANDA, C.D.; ZEMELMAN, R. Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. **Aquaculture**. 212: 31-47, 2002.

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

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

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STUDIES. PERFORMANCE STANDARDS FOR ANTIMICROBIAL DISK SUSCEPTIBILITY TESTS. 4TH ed. NCCLS document M2-A4. Villanova. USA. 1990.

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

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. **Diagnostic Manual For Aquatic Animal Diseases**. Chapt.I.1.B, Sampling Procedures. Paris: Oie, 2000.

PETERSEN, A.; DALSGAARD, A. Antimicrobial resistance of intestinal *Aeromonas* spp. and *Enterococcus* spp. in fish cultured in integrated broiler-fish farms in Thailand. **Aquaculture**. 219: 71-82, 2003.

PETERSEN, A.; ANDERSEN, J.S.; KAEWMAK, T.; SOMSIRI, T.; DALSGAARD, A. Impact of integrated fish farming on antimicrobial resistance in a pond environment. **Appl.Environ.Microbiol**. 68 (12): 6036-6042, 2002.

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

PRESCOT, J. F. Quimioterapia antimicrobiana. In: HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Microbiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. pp. 27-46.

PROENÇA, C.E.M.; BITTENCOURT, P.R.L. **Manual de Piscicultura Tropical**. Brasília, IBAMA, 1994.

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

RAMOS, M.; LYON, W.J. Reduction of endogenous bacteria associated with catfish using the grovac process. **J. Food Protection**. 63 (9): 1231-1239, 2000.

RASGUIDO, J.E. A.; ALBANEZ, J.R. Piscicultura em Minas Gerais. **Informe Agropecuário**. Mar-Abr: 32-37, 2000.

RINGO, E.; OLSEN, E.R.; MAYHEW, T.M.; MYKLEBUST, R. Electron microscopy of the intestinal microflora of fish. **Aquaculture**. 277: 395-415, 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.; MORTEN, S.B.; DALSGAARD, K.P. ET AL. Occurrence of antimicrobial resistance in fish pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 4908-4915, 2000.

SCHNICK, A. R. International harmonization of antimicrobial sensity determination for aquaculture drugs. **Aquaculture**. 196: 277-288, 2001.

SILVA, D.J. **Análise de alimentos (Métodos químicos e biológicos)**. 2 ed. Viçosa: UFV, 1998. 165p.

SMITH, J.T.; LEWIN, C.S. Mechanisms of antimicrobial resistance and implications for epidemiology. **Veterinary Microbiol.** 35: 233-242, 1993.

SORUM, H.; L'ABEE-LUND, T.M. Antibiotic resistance in food-related bacteria- a result of interfering with the global web of bacterial genetics. **Int. J. food Microbiol.** 78: 43-56, 2002.

SUGITA, H.; MIYAJIMA, C.; DEGUCHI, Y. The vitamin B12- producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish. *Aquaculture*.92: 267-276, 1991.

TAPIA, J.A.R. Antibiotic resistance, public health problem. *Anales Medicos* v.48, n.1: 42-47, 2003.

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

TEUBER, M. Veterinary use and antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*. 4: 493-499, 2001.

TENDENCIA, E.A.; dela PENA, L. D. Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. *Aquaculture*. 195: 193-204, 2001.

TENDENCIA, E.A.; dela PENA, L. D. Level and percentage recovery of resistance to oxtetracycline and oxolinic acid of bacteria from shrimp ponds. *Aquaculture*. 213: 1-13, 2002.

THRELFALL, E.J.; WARD, L.R.; FROST, J.A.; WILLSHAW, G.A. The emergence and spread of antibiotic resistance in food-borne bacteria. *Int. J. Food Microbiol*. 62: 1-5, 2000.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. *Microbiologia*. Porto Alegre: ArtMed, 2002. 830p.

VALENTI, W. C.; POTI, C.R.; PEREIRA, J.A.; BROGUETTI, J.R. Eds. **Aqüicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável**. Brasília: 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, 533p.

VIVEKANANDHAN, G.; SAVITHAMANI; HATHA, A.A.M. et al. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India. *Int. J. Food Microbiol*. 76: 165-168, 2002.

WALSH, D.; DUFFY, G; SHERIDAN, J.J.; BLAIR, I.S.; MACDOWELL, D.A.
Antibiotic resistance among *Listeria*, including *Listeria monocytogenes*, in retail
foods. **J.Appl. Microbiol.** 90: 517-522, 2001.

ANEXOS

ANEXO A

Página

TABELA1A

Quadro resumo da análise de variância e respectivos níveis de significância para os fatores tipos de ambiente (tipo), antibióticos (med) e interação (tipo x med)..... 49

TABELA2A Quadro de valores t e respectivos níveis de significância para as variáveis água de abastecimento, água de tanque, conteúdo intestinal, lavado de superfície, ração farelada, filés de tilápias frescos e filés de tilápias congelados em relação aos antibióticos ampicilina (AP), norfloxacina (NF), cloranfenicol (CO) e tetraciclina(TT)..... 49

TABELA 1 Quadro resumo de variância e respectivos níveis de significância para os fatores tipos de ambientes (tipo) e antibióticos (med) e interação (tipo x med).

FV	GL	Sq	Qm	F	P (>F)
Tipo	6	163,049	27,175	50,2215	< 2,2e-16 ***
Med	4	73,657	18,414	34,0312	1,034e-13***
Tipo: Med	24	60,907	2,538	4,6901	2,039e-06***
Resíduo	50	27,055	0,541	-	-
Códigos de significância: 0 `***' 0.001 `**' 0.01 `*' 0.05 `.' 0.1 `.' 1					

TABELA 2 Valores de “t” e respectivos níveis significância para as variáveis, água de abastecimento (intercepto), água de tanque (tipo2), conteúdo intestinal (tipo 3), lavado de superfície (tipo4), ração farelada (tipo5), filés de tilápias frescos (tipo6) e filés de tilápias congelados (tipo 7) em relação aos antibióticos ampicilina (AP), norfloxacina (NF), cloranfenicol(CO) e tetraciclina(TT).

Fonte de variação	Estimativa	Erro padrão	Valor de “t”	P (> t)
Intercepto	2,4400	0,7356	3,317	0,01701**
Tipo2	1,8900	1,0403	1,817	0,075244.
Tipo3	4,5300	0,9009	5,028	6,74e-06***
Tipo4	2,4950	0,9009	2,769	0,007860 **
Tipo5	3,7100	1,0403	3,566	0,000809 ***
Tipo: Med				
Tipo3: NF	-6,8400	1,2741	-5,369	2,06e-06 ***
Tipo7:NF	-2,4800	1,1396	-2,176	0,034288 *
Tipo3:CO	-2,4200	1,2741	-1,899	0,063289 .
Códigos de significância: 0 `***' 0.001 `**' 0.01 `*' 0.05 `.' 0.1 `.' 1				