

**DIVERSIDADE DA MICROBIOTA GRAM-
NEGATIVA EM SISTEMAS DE CULTIVO DE
TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)**

HALAN DENY DAL PUPO

2006

HALAN DENY DAL PUPO

**DIVERSIDADE DA MICROBIOTA GRAM-NEGATIVA
EM 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 Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Henrique César Pereira Figueiredo

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2006**

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

Dal Pupo, Halan Deny

Diversidade da microbiota gram-negativa em sistemas de cultivo de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Halan Deny Dal Pupo. – Lavras : UFLA, 2006.

42 p. : il.

Orientador: Henrique César Pereira Figueiredo.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Tilápia-doNilo. 2. Bactéria gram-negativa. 3. Sistema de cultivo. 4. Resistência a antibiótico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-639.3758

HALAN DENY DAL PUPO

**DIVERSIDADE DA MICROBIOTA GRAM-NEGATIVA EM
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 Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 30 de agosto de 2006

Prof. Dr. Rômulo Cerqueira Leite

UFMG

Profa. Dra. Adriana Mello Garcia

UFLA

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

UFLA

**Prof. Dr. Henrique César Pereira Figueiredo
UFLA
(Orientador)**

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL**

AGRADECIMENTOS

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

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

Ao professor Henrique César Pereira Figueiredo, que soube orientar-me com dedicação e competência, minha eterna gratidão.

À Profa. Roberta Hilsdorf Piccoli, pelo auxílio na orientação e apoio durante a realização do experimento.

Aos colegas de laboratório Prof. Geraldo Márcio (DMV), Dircéia e Ulisses, entre outros, pelo apoio e excelente convívio.

Aos colegas de pós-graduação Daniela Tupy, Gláucia, Gilberto, Flaviane, Marlon, Ziara, Rodrigo, Sandra, Aline, Victor, Cleube e ao graduando em Medicina Veterinária Carlos Augusto Leal, pelo auxílio na execução do experimento.

Aos amigos Bruno Henrique, Ana Augusta, Bruno, Leandro, Alexandre, Giovanni, Fernanda, Delton e Vinícius, entre outros, pelos momentos de descontração.

Aos colegas de república Geraldo, Sérgio, Ançano, Edson, Giuliani e Virgílio, pelo convívio e apoio.

Ao meu irmão Ian, especialmente aos meus pais, Juvelino e Glória, por toda a torcida e incentivo nos momentos em que mais precisei.

À minha namorada querida, Kênia pelo incentivo e apoio em todos os momentos.

À FAPEMIG pelo financiamento do projeto.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização e a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	i
ÍNDICE DE FIGURA	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Tilapicultura.....	3
2.1.1 Tilapicultura no Brasil	4
2.2 Tipos de cultivo	5
2.2.1 Sistema extensivo.....	5
2.2.2 Sistema semi-intensivo.....	5
2.2.3 Sistema intensivo.....	6
2.2.4 Sistema superintensivo.....	7
2.3 Microbiota bacteriana na água e nos peixes de água doce.....	7
2.4 Uso de dejetos de animais na piscicultura.....	9
2.5 Resistência bacteriana a antimicrobianos.....	11
2.6 Desenvolvimento de resistência bacteriana a antimicrobianos na piscicultura.....	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Bactérias	15
3.2 Reativação das culturas.....	16
3.3 Testes bioquímicos	16
3.4 Perfil de resistência a antimicrobianos	17
3.4.1 Perfil de múltipla resistência a antibióticos	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1 Frequência de gêneros e espécies isoladas nos diferentes sistemas analisados.....	19
4.1.1 Sistemas de cultivo	21
4.2 Perfil de resistência a antimicrobianos.....	27
5 CONCLUSÃO	34
REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1	Freqüência de famílias em 188 amostras de bactérias gram-negativas em sistemas de cultivo de tilápias-do-Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	19
TABELA 2	Diversidade de espécies de bactérias gram-negativas isoladas nos sistemas de cultivo	20
TABELA 3	Diversidade de espécies gram-negativas isoladas no sistema tanque alvenaria + ração.....	22
TABELA 4	Diversidade de espécies gram-negativas isoladas no sistema tanque terra + ração	23
TABELA 5	Diversidade de espécies gram-negativas isoladas no sistema tanque terra + adubo orgânico.....	24
TABELA 6	Potencial patogênico de bactérias gram-negativas isoladas de sistemas de cultivo de tilápias-do-Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	26
TABELA 7	Freqüências de múltipla resistência a antimicrobianos de isolados de espécies bacterianas oriundas de sistemas de cultivo de tilápias-do-Nilo	30

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	Frequência de múltipla resistência a antimicrobianos em sistema de cultivo de tilápia.....	33
----------	--	----

RESUMO

DAL PUPO, Halan Deny. **Diversidade da microbiota gram-negativa em sistemas de cultivo de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2006. 42 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

O objetivo do trabalho foi verificar a diversidade da microbiota gram-negativa em três diferentes sistemas de cultivo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) constituídos por: sistema 1 (tanque de alvenaria com arraçoamento dos animais utilizando ração comercial peletizada), sistema 2 (tanque de terra com arraçoamento dos animais utilizando ração comercial peletizada) e sistema 3 (tanque de terra com adubação orgânica). A partir de um banco de bactérias previamente obtido nos três sistemas de cultivo, foram selecionadas 188 amostras de bactérias gram-negativas para a identificação bacteriana em gênero ou espécie. As bactérias foram submetidas aos testes de triagem de catalase, oxidase e oxidação-fermentação (O-F) e, seqüencialmente, aos testes de identificação fenotípica Bac-Tray I e II (Laborclin, Brasil), API 20E e API 20NE (BioMérieux, França), para a identificação final. Uma amostra de cada gênero e ou espécie identificados foi submetida ao teste de antibiograma de disco de difusão, utilizando-se os seguintes antibióticos: ampicilina, cefuroxima, cloranfenicol, florfenicol, eritromicina, gentamicina, nitrofurantoína, norfloxacin, sulfonamidas e tetraciclina. Doze famílias bacterianas foram identificadas entre os diferentes sistemas. Aeromonadaceae (94 isolados, 50%), seguida por Enterobacteriaceae (45 isolados, 24%) e Pseudomonadaceae (15 isolados, 8) predominaram entre os sistemas, gerando um total de 43 espécies bacterianas diferentes. *Aeromonas hydrophila* (34 isolados, 18%) foi a espécie bacteriana com maior isolamento. A frequência de gêneros e espécies isoladas nos diferentes sistemas apresentou uma diversidade maior que as previamente relatadas na literatura. Os sistemas de cultivo analisados apresentaram perfis de microbiota gram-negativa similares. A maioria dos isolados foi resistente à eritromicina e à ampicilina e susceptível à norfloxacin e ao florfenicol; 95% apresentaram índice MAR maior ou igual a 0,2, o que indica multirresistência. Portanto, os sistemas de cultivo analisados constituem fontes de alto risco para a manutenção e a disseminação de resistência bacteriana a diversos antibióticos.

¹ Comitê orientador: Henrique César Pereira Figueiredo–UFLA (Orientador), Roberta Hilsdorf Piccoli–UFLA (Co-orientador).

ABSTRACT

DAL PUPO, Halan Deny. **Diversity of Gram-negative microbiota in different culture systems of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*).**

2006. 42 p. Thesis essay (Master degree in Veterinary Sciences) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil²

The aim of this work was to evaluate the diversity of Gram-negative microbiota in three different systems of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). The three culture systems were characterized by: system 1, concrete pond and commercial pelleted feed; system 2 land pond and commercial pelleted feed; and system 3, land pond and animal manure fertilization. The strains were previously isolated and stored in freezing medium under low temperature (-70°C). One hundred eighty eight gram-negative strains were selected for bacterial identification. The strains were submitted to gram stain, catalase, oxidase, oxidation-fermentation test (O-F) and characterized by bacterial identification kits Bac-Tray I and II (Laborclin, Brazil), API 20E and API 20 NE (Biomerieux, France). One strain of each bacterial genus and species were selected for antibacterial susceptibility testing. Antimicrobials resistance patterns were determined by an agar disk diffusion method (CLSI, 2006). Disks containing the following agents were used: ampicillin, cefuroxime, chloramphenicol, florfenicol, erythromycin, gentamicin, nitrofurantoin, norfloxacin, sulfonamide and tetracycline. A total of 12 different bacterial families were identified. Aeromonadaceae (50%), Enterobacteriaceae (24%) and Pseudomonadaceae (15%) were the most frequent bacterial families in all culture systems analyzed. *Aeromonas hydrophila* was the predominant bacterial species isolated in the three culture systems. It was observed a higher diversity of gram-negative bacteria than previous studies. The three different culture systems showed similar patterns of gram-negative microbiota. Erythromycin and ampicillin were the antibiotics with higher levels of resistant bacteria. In contrast norfloxacin and florfenicol showed low frequencies of resistant bacteria. Ninety five percent of the strains showed MAR (Multiple antibiotic resistance) index $\geq 0,2$ being characterized as multiresistant. The three different culture systems analyzed show high levels of antibiotic resistant bacterial populations might be a risk source for human and animals.

²Tutorial Committee: Henrique César Pereira Figueiredo–UFLA (advisor) & Roberta Hilsdorf Piccoli–UFLA (Co-advisor).

1 INTRODUÇÃO

A aqüicultura brasileira tem apresentado altas taxas de crescimento, com estimativas em torno de 30% ao ano. Esse tipo de exploração animal vem se tornando cada vez mais importante como fonte de proteínas para o consumo humano. A piscicultura de água doce está presente em todos os estados do Brasil, concentrada em pequenas propriedades rurais de cultivo.

Os tipos de sistemas de cultivo mais utilizados na piscicultura brasileira são tanque-rede, tanque de alvenaria, tanque de terra escavado e sistemas de fluxo contínuo ou “raceways”. O uso de tanques escavados prevalece pelo modo de cultura tradicional, pelo baixo custo e ainda pela praticidade de implantação.

O cultivo de peixes em tanques escavados pode ser realizado de duas maneiras, intensiva e semi-intensiva, de acordo com a viabilidade econômica e o intuito da produção. Em sistemas semi-intensivos, realiza-se, como prática comum, a adubação dos tanques. A adubação mista, geralmente, é realizada inicialmente, utilizando adubos inorgânicos e orgânicos, para que, respectivamente, promovam um ambiente inicial em médio prazo para o desenvolvimento do fitoplancton, fonte de alimento para espécies de peixes planctófagas, como e o caso da espécie tilápia-do-Nilo. Fezes de aves compostadas são resíduos da indústria avícola comumente utilizado para adubação orgânica de tanques escavados, visto seu reduzido custo e alto valor biológico (ricas em composto nitrogenados) como substrato para o desenvolvimento da população fitoplanctônica.

Apesar de contribuir para o aumento da produção piscícola, o fornecimento de matéria orgânica pode ocasionar queda na qualidade da água e prejudicar a saúde dos animais e seres humanos, podendo carrear resíduos de

antibióticos ou bactérias resistentes a essas drogas para o ambiente de criação, causando danos à produção, além de poluição dos recursos naturais.

Os sistemas intensivos são caracterizados por arraçoamento e maior densidade de estocagem dos peixes nos tanques, objetivando uma otimização do processo produtivo. Rações para peixes podem apresentar altos níveis protéicos; espécies carnívoras na fase de alevinos chegam a até 40% de proteína bruta na ração. O acúmulo de ração no tanque de cultivo aumenta o teor de matéria orgânica diluída na água e fornece substrato para desenvolvimento microbiano, podendo modular a diversidade da microbiota.

A microbiota aquática está relacionada, quantitativamente e qualitativamente, com aspectos físico-químicos e microbiológicos do ambiente. As bactérias melhor adaptadas ao ambiente aquático são pertencentes aos gêneros *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas* e *Vibrio*. Esses microrganismos fazem parte da microbiota da água, pele, brânquias e intestino dos peixes, sendo considerados oportunistas e, quando há desequilíbrio dos sistemas bactéria-hospedeiro-ambiente, podem desencadear epizootias.

Até o presente momento, no Brasil, não existem estudos sobre a capacidade dos diferentes sistemas e manejos de engorda em selecionar bactérias gram-negativas no ambiente de cultivo.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi determinar a diversidade da microbiota gram-negativa em diferentes sistemas de cultivo de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e o padrão de resistência aos antimicrobianos apresentado por essas bactérias.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Tilapicultura

O crescimento da participação percentual da produção de pescado de água doce na produção total do pescado brasileiro se deve tanto à redução dos estoques pesqueiros naturais ameaçados pela sobrepesca e captura predatória e pela degradação dos locais de pesca, em decorrência da expansão imobiliária e do turismo nas regiões litorâneas, quanto pela piscicultura, a partir da década de 1990, nos estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais. A região sul do Brasil lidera a produção aquícola nacional, sendo os estados do Paraná e Santa Catarina os maiores produtores de pescados cultivados. O estado de Santa Catarina destaca-se como grande produtor de moluscos, peixes e crustáceos cultivados, enquanto o estado do Paraná dedica-se à produção de pescado de água doce em cativeiro, principalmente tilápias (Rissato, 2001).

Dados publicados pela FAO, em 2006 indicam que a produção pesqueira em 2004, foi de 59,4 milhões de toneladas, incluindo a pesca e a aquíicultura. A aquíicultura foi responsável por 41,3 milhões de toneladas (69,6%), gerando um volume de receitas de US\$ 70,3 bilhões. Entre os anos de 1999 e 2001, o volume de pescado capturado no mundo cresceu 7,8% e a aquíicultura, 187,6%. Com relação ao volume de produção na aquíicultura, os peixes foram os que contribuíram com a maior produção, 24,4 milhões de toneladas. O Brasil ficou na 7ª posição (69.078 toneladas) no ranking mundial da produção de pescado oriundo da aquíicultura. A aquíicultura continental respondeu por 78,1% (164 mil toneladas), sendo a carpa o peixe mais cultivado (64,8 mil toneladas), seguido pela tilápia (38,53 mil toneladas) (Mello, 2004).

2.1.1 Tilapicultura no Brasil

A tilapicultura de exportação no país tem crescido a taxas ao redor de 35%/ano, nos últimos anos (Firetti & Sales, 2004). No ano de 2004, aproximadamente 113 mil toneladas de tilápia foram importadas pelos EUA, o que representou cerca de 15% a mais que as importações recordes ocorridas no anos de 2003.

Em termos de filé fresco, a América Latina é o maior fornecedor para o mercado dos EUA, sendo o Equador, Costa Rica e Honduras os principais exportadores. O Brasil, apesar de contribuir com uma parcela bastante reduzida das importações norte-americanas de tilápia, forneceu, em 2004 cerca, de 320 toneladas de filés frescos para os EUA, o que representou quase o triplo da quantidade exportada no ano de 2002 (Firetti & Sales, 2004).

Cultivada em mais de 100 países, a tilápia, originária do rio Nilo, África, é um dos peixes mais expressivos, em termos econômicos, na aquicultura mundial. Depois das carpas, é o peixe mais cultivado no mundo, sendo produzido, principalmente, na China, Indonésia, Tailândia, Filipinas, Equador, Colômbia e Brasil. No Brasil, a tilápia-do-Nilo, proveniente da Costa do Marfim, no oeste africano, foi introduzida no nordeste, em 1971 e, então, distribuída pelo país (Pacheco, 2004).

A tilápia-do-Nilo destaca-se como peixe de potencial para aquicultura, devido a sua rusticidade, crescimento rápido e adaptação ao confinamento; possui hábito alimentar onívoro e aceita rações com grande facilidade, desde o período de pós-larva até a fase de terminação (Boscolol, 2001). Já as tilápias vermelhas têm alcançado melhores preços de mercado quando comparadas à tilápia-do-Nilo devido a sua aparência (Carneiro, 1999). A tilápia é, entre as espécies de peixes mais cultivadas, a que melhor resiste à alta temperatura, a baixa concentração de oxigênio dissolvido e à alta concentração de amônia na água e ainda tem baixo custo relativo, principalmente quanto ao alevino e à

alimentação. A espécie de tilápia preferida para o cultivo é a *Oreochromis niloticus*, por causa do seu rápido crescimento e de sua coloração clara (Boscolol, 2001).

2.2 Tipos de cultivo

O fluxo da cadeia produtiva da tilápia está organizado nos larvicultores (fornecedores de alevinos para o mercado) e piscicultores de recria e engorda. De acordo com a intensidade de estocagem, práticas de manejo e do uso de insumos, a engorda de tilápias pode ser feita nos sistema extensivo, semi-intensivo, intensivo e superintensivo.

2.2.1 Sistema extensivo

No sistema extensivo de produção de tilápias, a intervenção do homem praticamente inexistente. Geralmente, limita-se à simples estocagem de 500 a 1.000 alevinos/ha de lamina de água, sem qualquer manejo de fertilização do corpo de água (represa ou açude) ou alimentação dos animais até a colheita. A alimentação dos peixes é baseada na produtividade natural do corpo de água e, como consequência, na disponibilidade de nutrientes na água e na bacia de captação. As trocas de água nesse sistema estão, geralmente, limitadas às chuvas. As produtividades variam de 150 a 500 kg/ha/ano e os peixes são quase sempre coletados 12 a 18 meses após a estocagem, com rede de arrasto ou de espera, uma vez que, raramente, é possível esgotar esses corpos de água (Zimmermann & Fitzsimmons, 2004).

2.2.2 Sistema semi-intensivo

O sistema semi-intensivo tem uma intervenção moderada pelo piscicultor. A estocagem é de 5.000 a 25.000 alevinos por ha e adição de fertilizantes químicos e adubos orgânicos visa promover a produtividade natural.

As águas do viveiro são de coloração verde, porém, a principal fonte de alimento das tilápias são as formulações peletizadas, fareladas ou umedecidas, quase sempre balanceadas com 20% a 28% PB. A ração é, geralmente, oferecida a uma taxa de 30 a 50 kg/ha/dia. Análises de qualidade de água são realizadas periodicamente e a temperatura e a transparência verificadas diariamente. As trocas de água diárias do sistema são, geralmente, superiores a 5% e inferiores a 10% do volume total. As produtividades obtidas variam de 2.500 a 12.500 kg/ha/safra. A safra varia de quatro a oito meses neste sistema (Zimmermann & Fitzsimmons, 2004).

A fertilização dos viveiros pode ser química ou orgânica. Os fertilizantes químicos utilizados são, geralmente, os mesmos utilizados na agricultura, sendo o fósforo e o nitrogênio os principais elementos a serem utilizados. A fertilização orgânica é feita com esterco de animais (geralmente aves e suínos) que contém nutrientes semelhantes aos fertilizantes químicos, porém em quantidades menores. A quantidade de fertilizantes a ser utilizada irá depender, principalmente, do tipo de solo e do fertilizante (Ostrenski & Boeger, 1998).

2.2.3 Sistema intensivo

No sistema intensivo o piscicultor atua de forma decisiva e a taxa de estocagem é elevada de 25.000 a 100.000 alevinos/ha. A colocação de fertilizantes orgânicos praticamente inexistente, pois a promoção da produtividade natural deve ser muito controlada. A principal fonte de alimento das tilápias é a ração peletizada, extrusada ou umedecida, quase sempre balanceada, com, pelo menos, 5% de farinha de peixes e com 32% proteína bruta. A ração é fornecida, em média, duas vezes ao dia, de acordo com o tamanho e a idade dos peixes, seguindo o metabolismo do viveiro e a temperatura. As trocas diárias de água variam de 10% a 35% do volume total e eventuais períodos de falta d'água

devem ser compensados pela aeração constantes dos açudes (Zimmermann & Fitzsimmons, 2004).

2.2.4 Sistema superintensivo

O cultivo de peixes em tanques-redes, na forma mais comumente empregada, é um sistema de produção intensivo no qual os peixes são confinados sob altas densidades, dentro de estruturas que permitam grande troca de água com o ambiente e no qual os peixes recebem ração nutricionalmente completa e balanceada. A produção de uma grande biomassa por unidade de volume (30 a 250 peixes/m³) é possível neste sistema, devido à alta taxa de renovação de água dentro das unidades que supre a demanda de oxigênio dos peixes e remove os dejetos e metabólitos produzidos. Além da qualidade do ambiente aquático onde estão instalados os tanques-rede, o desempenho do cultivo depende da qualidade dos insumos como alevinos e ração, das técnicas de manejo da produção e, sobretudo, da dedicação e da capacidade técnica e gerencial do produtor (Ono & Kubitzka, 2003).

2.3 Microbiota bacteriana na água e nos peixes de água doce

Embora não haja certeza sobre a existência de bactérias estritamente aquáticas, acredita-se que a maioria das bactérias dentro de ambientes aquáticos seja originária de solos e conduzidas para a água por chuvas ou pela introdução acidental. Porém, todo corpo de água tem sua microbiota indígena, embora possam variar grandemente nos grupos presentes e em número de células (Miranda & Zemelman, 2001).

As bactérias melhor adaptadas à vida em solo e água pertencem aos gêneros de *Bacillus* e *Pseudomonas*. Porém, outros grupos podem estar presentes em várias ocasiões na água doce, incluindo membros da família Enterobacteriaceae e gêneros como *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Moraxella*,

Aeromonas, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e bactérias anaeróbias como o gênero *Clostridium* sp. Os baixos índices de contaminantes encontrados nas brânquias e na pele dos peixes são comumente associados a águas limpas e frias, e os índices elevados às águas tropicais, subtropicais e áreas poluídas. No intestino de peixes alimentados, o índice de microrganismos contaminantes é alto (Toranzo et al., 1989).

A microbiota presente na superfície corporal dos peixes, brânquias e trato digestório está relacionada, quantitativa e qualitativamente, com aspectos físico-químicos e microbiológicos do ambiente, havendo grande variabilidade no perfil da microbiota bacteriana nas diferentes espécies de peixes e sistemas de cultivo e ou ambientes. Assim, peixes capturados em ambientes poluídos por esgotos e dejetos em geral albergam indicadores de poluição fecal e microrganismos patogênicos. A transmissão de enfermidades entéricas após consumo de alimentos à base de pescado pode estar relacionada com a ingestão de peixes contaminados no ambiente hídrico (Muratori et al., 2000).

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). Acredita-se que diferentes tipos de manejo e sistemas de cultivo possam favorecer a seleção de bactérias resistentes a antibióticos (Petersen & Dalsgaard, 2003a).

O perfil da microbiota em pisciculturas é predominantemente constituída por bactérias gram-negativas. Carneiro (2005) comparou e avaliou a diversidade de populações bacterianas em diferentes sistemas de cultivos de tilápia-do-Nilo constituídos por: sistema 1: tanque de alvenaria com arraçoamento; sistema 2: tanque de terra com arraçoamento e sistema 3: tanque de terra com adubação orgânica. Foram isoladas as seguintes famílias: Enterobacteriaceae (45 amostras), Micrococcaceae (87 amostras), Pseudomonadaceae (65 amostras) e

Vibrionaceae (115 amostras). As populações bacterianas apresentaram-se mais altas no sistema 3 (tanque de terra com adubação orgânica) ($P \leq 0,05$), seguidas pelas do sistema 1 (tanque de alvenaria com arraçoamento) e mais baixas no sistema 2 (tanque de terra com arraçoamento) ($P < 0,01$).

Miranda & Zemelman (2002a) avaliaram a diversidade da microbiota bacteriana e a resistência a antimicrobianos em diferentes fazendas chilenas especializadas no cultivo de salmão de água doce. A microbiota das fazendas de salmão mostrou-se predominantemente constituída por bactérias gram-negativas não-fermentadoras (77,7% das amostras), porém, a espécie mais freqüente foi *Aeromonas hydrophila*. Nedoluha & Westhoff (1997) estudaram a taxa de renovação de água em diferentes sistemas de cultivo (tanque de terra, tanques com alta renovação de água e tanques com recirculação de água) de “striped bass” (*Morone saxatilis*) híbridos. Estes autores buscaram determinar o efeito sobre a dinâmica da população bacteriana nos diferentes microambientes (superfície corporal, brânquia, conteúdo intestinal e água do tanque). Semelhante ao trabalho de Miranda & Zemelman (2002a), o gênero *Aeromonas* predominou em todos os microambientes, não havendo diferenças nas contagens bacterianas entre os sistemas de cultivo com diferentes taxas de renovação de água analisados.

O perfil da microbiota bacteriana pode ser determinada por fatores físico-químicos da água. A microbiota bacteriana em sistemas de cultivo de tilápia-do-Nilo em água salobra apresentou menor diversidade de espécies bacterianas quando comparada a sistemas de cultivo de água doce. Nessas condições, predominaram bactérias do gênero *Vibrio* (Al-Harbi & Uddin, 2005).

2.4 Uso de dejetos de animais na piscicultura

Entre os diferentes tipos de criação de peixes, o sistema de produção integrada 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 a produtividade (Kubitza, 2001). 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 & Dalsgaard, 2003a).

Neste sistema, os peixes podem se alimentar dos dejetos de forma direta, aproveitando os nutrientes não digeridos, ou indireta, já que as bactérias podem agir sobre a matéria orgânica, transformando-a em nutrientes inorgânicos, favorecendo o desenvolvimento do fitoplâncton, base alimentar para o zooplâncton e outros organismos que servem de alimento para os peixes (Cecarelli & Figueira, 2001).

Apesar de contribuir para o aumento da produção piscícola, o fornecimento de matéria orgânica, quando feito de forma incorreta, pode ocasionar queda na qualidade da água e prejudicar a saúde dos animais e seres humanos, com a presença de patógenos indesejáveis, causando danos à produção, além de poluição dos recursos naturais (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 por meio da água ou de organismos aquáticos, representando um grande risco para saúde pública. Dentre as bactérias patogênicas que podem ser carregadas pelo adubo orgânico, destacam-se *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* sp. *enterica*, *Salmonella Typhi*, *Shigella* sp. 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, de 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, como suínos e aves, 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 genes de resistência a antimicrobianos serem disseminados dentro de uma ampla variedade de bactérias no ambiente aquático (Petersen et al., 2002).

2.5 Resistência bacteriana a antimicrobianos

O aumento da introdução de agentes antimicrobianos no ambiente, seja por terapia médica, animal ou na agricultura, resultou em novas pressões seletivas em populações bacterianas. Isso tem se tornado um dos principais problemas de saúde pública, pela propagação da resistência a antimicrobianos entre bactérias patogênicas, dificultando o tratamento clínico de pacientes (Bogaard & Stobbleringh, 2000; Rivera-Tapia, 2003).

Na presença de genes de resistência, a seleção de uma subpopulação de microrganismos resistentes pode ser consequência da pressão de seleção devido

ao uso de antimicrobianos, que pode ser mais efetiva quando os 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, carregada 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 a aquisição de genes de resistência é a transferência de plasmídeos entre bactérias da mesma espécie, filogeneticamente distantes ou com hábitat distintos. Isso 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; Rivera-Tapia, 2003; Smith & Lewin, 1993).

As bactérias possuem mecanismos bem caracterizados pelos quais se tornam resistentes a antibióticos. Dentre esses, destacam-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 antimicrobianos são freqüentemente 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).

Dentre as diversas rotas de comunicação entre reservatórios de resistência a antimicrobianos 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 antimicrobianos 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).

2.6 Desenvolvimento de resistência bacteriana a antimicrobianos na piscicultura

Embora a maioria dos estudos sobre 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 isso porque 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) relatam que o uso profilático de antibióticos na aquíicultura 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 piscicultura, as drogas mais utilizadas são oxitetraciclina, sulfá/trimetoprim e norfloxacin. Porém, não existem ainda antibióticos licenciados para uso em piscicultura no Brasil.

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 utilizada para consumo nem sempre é tratada. Assim, bactérias resistentes a antibióticos em pisciculturas podem ser carregadas aos seres humanos pelo consumo de água não tratada (Alderman & Hastings, 1998).

O uso profilático de antibióticos na aquicultura afeta a densidade de bactérias no tanque de cultivo a frequência de resistência a antimicrobianos pode refletir o uso dos mesmos durante o cultivo de camarão. Assim, sugere-se que parte dos antimicrobianos administrados na ração passa 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 Penã, 2002).

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

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Bactérias

As amostras utilizadas foram previamente coletadas e isoladas no Setor de Piscicultura da UFLA, onde foi realizada análise quantitativa da ocorrência de bactérias em diferentes sistemas de cultivo de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) com manejos distintos, constituídos por: sistema 1 (tanque de alvenaria com arraçoamento), sistema 2 (tanque de terra com arraçoamento) e sistema 3 (tanque de terra com adubação orgânica), sem utilização prévia de antibióticos, localizados na mesma propriedade e com quatro meses de povoamento, com densidade de 2,5 peixes/m².

Os sistemas de cultivo 1, 2 e 3 foram contemporâneos, tendo todas as coletas nos diferentes microambientes sido realizadas em dias diferentes, com intervalo máximo de uma semana entre elas. A água de abastecimento foi proveniente de açude próprio, que represava água de chuva não tratada, sendo uma fonte comum entre os diferentes sistemas de cultivo. Foram coletadas, em frascos estéreis, amostras da água de abastecimento em dois pontos, antes de atingir a bifurcação para os diferentes sistemas (Carneiro, 2005).

De cada sistema analisado, foram coletadas amostras de quatro microambientes (água de abastecimento, água do tanque, muco de superfície e conteúdo intestinal). As amostras foram submetidas à diluição seriada para a quantificação de populações bacterianas totais. A partir da melhor diluição de cada amostra (30-300 colônias/placa), foram selecionadas e repicadas, em ágar soja tripticaseína (TSA), cinco colônias de diferentes morfotipos. 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. Foram obtidas 258 amostras gram-negativas e 87 amostras gram-positivas, as quais foram armazenadas em freezer -80°C.

A partir desse banco de bactérias, foram selecionadas, aleatoriamente, 188 amostras gram-negativas isoladas de cada sistema de cultivo (sistemas 1,2 e 3), para análise de identificação em gênero e espécie.

3.2 Reativação das culturas

As amostras foram submetidas ao descongelamento em temperatura ambiente. Em seguida, foram semeadas por estrias em TSA e incubadas, a 30°C, por 24 horas, para verificação da pureza dos isolados.

3.3 Testes bioquímicos

Para cada amostra, foram feitos os testes de triagem de gram, catalase, oxidase e oxidação-fermentação (O-F). Para as amostras bacterianas oxidase negativa, foi utilizado o kit de identificação bioquímica Bac-Tray I e II (Laborclin, Brasil). As amostras bacterianas que apresentavam percentual de identificação fenotípica inferior a 80% eram repicadas novamente e repassadas para os kits API 20E e API 20NE (BioMérieux, França). Todos os kits foram utilizados conforme instruções dos fabricantes. Foram utilizadas, como controle de qualidade dos kits, as bactérias *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

Para as amostras de bactérias catalase positivas, oxidase positivas e fermentadoras sugestivas de *Aeromonas* sp., foram realizados os testes: fermentação de carboidratos (arabinose, manitol, myo-inositol, sacarose, salicina, glicose, trealose e dextrina), utilização de aminoácidos (lisina, ornitina e arginina), hidrólise de esculina e produção de acetoina (Voges-Proskauer) (Bergey's Manual, 1984; Janda & Abbot, 1998). Para os testes de utilização de

aminoácidos, empregou-se o caldo Möeller descarboxilase (Biolife, Itália), suplementado com os respectivos aminoácidos, na concentração de 1% (Mac Faddin, 1980). A hidrólise de esculina foi avaliada utilizando-se o caldo base acrescido de esculina (Merck, USA) (Quinn et al., 1994). Para validação da metodologia de identificação, foi utilizada a amostra de referência *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966.

Após o período de incubação, os resultados foram lidos e interpretados pelos softwares de identificação bioquímica Bac-Tray (Laboreclin, BRASIL) e API-WEB (BioMérieux, FRANCE).

3.4 Perfil de resistência a antimicrobianos

A partir das 188 amostras de bactérias gram-negativas, foi selecionada uma amostra de cada gênero e ou espécie bacteriana identificada de cada sistema de cultivo. Essas amostras foram submetidas à determinação do perfil qualitativo de resistência a antibióticos, pelo método de discos de difusão, utilizando-se ágar Mueller Hinton (Difco, EUA) (CLSI, 2006). Os antibióticos utilizados foram: ampicilina 10µg, cefuroxima 30µg, cloranfenicol 30µg, eritromicina 15µg, gentamicina 10µg, florfenicol 30µg, nitrofurantoína 300µg, norfloxacina 10µg, tetraciclina 30µg e sulfonamidas 300µg. Foram utilizadas, como controle de qualidade do teste, as amostras de referência *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Cada amostra bacteriana foi repicada em TSA, de onde foi coletada uma porção de massa bacteriana e foi suspensa e homogeneizada em solução salina 0,85% estéril, sendo a turbidez da suspensão comparada à do padrão 0,5 da escala de McFarland. Por meio de suabes 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 pinças previamente flambadas. As placas foram

incubadas em estufa bacteriológica, a 30°C, durante 18-24 horas. Após o período de incubação, os diâmetros dos halos de inibição foram medidos e comparados com a tabela de performance padrão para os testes de susceptibilidade a antibióticos, sendo classificado como sensíveis ou resistentes.

3.4.1 Perfil de múltipla resistência a antibióticos

A partir dos resultados dos antibiogramas, o índice múltipla resistência a antibióticos (MAR), foi calculado como o número de drogas ao qual determinado isolado foi resistente sobre o número total de drogas (dez, neste caso). O índice MAR acima de 0,2 indica multirresistência (Krumperman, 1983).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Frequência de gêneros e espécies isoladas nos diferentes sistemas analisados

Das 188 amostras bacterianas gram-negativas isoladas dos sistemas de cultivo de tilápia-do-Nilo foram identificadas 12 famílias diferentes. Os dados obtidos mostraram o predomínio de membros da família Enterobacteriaceae seguida por Aeromonadaceae e Pseudomonadaceae, respectivamente, entre os diferentes sistemas de cultivo (Tabela 1).

TABELA 1 Frequência de famílias em 188 amostras de bactérias gram-negativas de diferentes sistemas de cultivo de tilápia- do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Famílias	Frequência (%)
Aeromonadaceae	94 (50)
Enterobacteriaceae	45 (24)
Pseudomonadaceae	15 (8)
Burkholderiaceae	10 (5)
Xanthomonadaceae	5 (3)
Alcaligenaceae	2 (1)
Sphingomonadaceae	2 (1)
Caulobacteraceae	1 (0,6)
Neisseriaceae	1 (0,6)
Pasteurellaceae	1 (0,6)
Shewanellaceae	1 (0,6)
Vibrionaceae	1 (0,6)
Não identificadas	10 (5)

Os dados da Tabela 2 representam a diversidade de espécies bacterianas presentes nos sistemas de cultivo analisados. Todos os sistemas de cultivo apresentaram perfil de diversidade de espécies semelhantes. *Aeromonas hydrophila* foi a espécie bacteriana com maior frequência de isolamento, seguida por *Aeromonas* sp, *Enterobacter cloacae* e *Pseudomonas fluorescens*. Dez amostras bacterianas isoladas em todos os sistemas analisados não foram passíveis de identificação pela metodologia utilizada. De modo geral, a família Aeromonadaceae apresentou maior frequência de isolamento em todos os sistemas, pois é considerada parte da microbiota de ambientes aquáticos.

TABELA 2 Diversidade de espécies de bactérias gram-negativas isoladas nos sistemas de cultivo de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Espécies:	Sistema 1	Sistema 2	Sistema 3
<i>Aeromonas caviae</i>	-	+	+
<i>Aeromonas eucrenophila</i>	+	+	+
<i>Aeromonas hydrophila</i>	+	+	+
<i>Aeromonas jandaei</i>	+	+	+
<i>Aeromonas media</i>	-	-	+
<i>Aeromonas schubertii</i>	+	-	+
<i>Aeromonas</i> sp.	+	+	+
<i>Aeromonas trola</i>	+	+	+
<i>Aeromonas veronii</i> bt <i>sobria</i>	-	+	-
<i>Alcaligenes faecalis</i>	-	-	+
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	-	+	-
<i>Burkholderia cepacia</i>	+	+	-
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	-	+	-
<i>Chromobacterium violaceum</i>	-	-	+
<i>Citrobacter freundii</i>	-	+	-
<i>Citrobacter koseri</i>	+	-	-
<i>Enterobacter amnigenus</i>	-	+	-
<i>Enterobacter asburiae</i>	+	+	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	+
<i>Enterobacter sakasaki</i>	+	+	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	+
<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	+	-	-

“...continua...”

“TABELA 2, cont.”

Espécies:	Sistema 1	Sistema 2	Sistema 3
<i>Hafnia alvei</i>	+	-	-
<i>Klebsiella ozaenae</i>	-	-	+
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	-	-
<i>Pantoea</i> sp.	+	+	-
<i>Pasteurella multocida</i>	-	+	-
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	+	+	+
<i>Providencia stuartii</i>	-	+	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	+	+
<i>Pseudomonas putida</i>	-	+	+
<i>Pseudomonas luteola</i>	+	-	-
<i>Rahnella aquatilis</i>	+	-	-
<i>Ralstonia pickettii</i>	+	+	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	+	+	-
<i>Serratia plymuthica</i>	+	-	-
<i>Shewanella putrefaciens</i>	-	-	+
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	-	+	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+	+	-
<i>Vibrio vulnificus</i>	-	-	+
<i>Wautersia paucula</i>	-	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	+	+
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	-	+	-
Espécie não identificada (n=10)	+	+	+
Total:	23	26	21

Legenda: Sistema 1 (tanque alvenaria + ração), Sistema 2 (tanque terra + ração) e Sistema 3 (tanque terra + adubo); (+) isolado, (-) não isolado.

4.1.1 Sistemas de cultivo

O sistema 1 (tanque alvenaria + ração) apresentou um total de 24 espécies bacterianas (Tabela 3), sendo o muco de superfície o microambiente com maior diversidade, seguido por água do tanque, água de abastecimento e conteúdo intestinal. Cinco amostras oriundas da água de abastecimento, água do tanque e conteúdo intestinal não foram passíveis de identificação pela metodologia utilizada. O muco de superfície apresentou predomínio de membros da família Aeromonadaceae e, na água do tanque, membros da família Enterobacteriaceae predominaram, com o mesmo número de espécies.

TABELA 3 Diversidade de espécies gram-negativas isoladas no sistema tanque alvenaria + ração

Espécies:	Aa	Tq	Ms	Ci
<i>Aeromonas eucrenophila</i>	-	-	+	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-	+	-
<i>Aeromonas jandaei</i>	-	-	+	-
<i>Aeromonas schubertii</i>	-	-	-	+
<i>Aeromonas</i> sp.	-	-	+	+
<i>Aeromonas trola</i>	-	-	+	-
<i>Burkholderia cepacia</i>	+	-	+	-
<i>Citrobacter koseri</i>	-	+	-	-
<i>Enterobacter asburiae</i>	+	+	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	+	-
<i>Enterobacter sakasaki</i>	-	+	-	-
<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	-	-	+	-
<i>Hafnia alvei</i>	-	+	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	-	-	-
<i>Pantoea</i> sp.	-	-	+	-
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	-	-	-	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	-	-	+
<i>Pseudomonas luteola</i>	-	-	+	-
<i>Rahnella aquatilis</i>	-	+	-	-
<i>Ralstonia pickettii</i>	-	+	+	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	-	-	+	-
<i>Serratia plymuthica</i>	-	-	+	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+	-	+	-
Espécie não identificada (n=1)	-	-	+	-
Total:	5	6	15	4

Legenda: Aa (água abastecimento); Tq (água tanque); Ms (muco superfície); Ci (conteúdo intestinal); (+) isolado, (-) não isolado.

O sistema 2 (Tanque terra + ração) foi o que apresentou maior diversidade de espécies dentre os sistemas avaliados n=26 (Tabela 4). De maneira similar ao sistema 1, o sistema 2 teve, no microambiente muco de superfície, a maior diversidade bacteriana observada, seguido por água do tanque, água de abastecimento e conteúdo intestinal. Cinco amostras desse sistema não foram identificadas. No sistema 2, houve predomínio das famílias

Aeromonadaceae (água do tanque e conteúdo intestinal) e Enterobacteriaceae (água de abastecimento e muco de superfície).

TABELA 4 Diversidade de espécies gram-negativas isoladas no sistema tanque terra + ração

Espécies:	Aa	Tq	Ms	Ci
<i>Aeromonas caviae</i>	-	-	+	-
<i>Aeromonas eucrenophila</i>	-	+	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	+	+	+	+
<i>Aeromonas jandaei</i>	-	-	-	+
<i>Aeromonas</i> sp.	-	+	+	-
<i>Aeromonas veronii</i> bt <i>sobria</i>	-	+	-	+
<i>Burkholderia cepacia</i>	+	-	+	-
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	-	-	+	-
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	-	-	+	-
<i>Citrobacter koseri</i>	-	-	+	-
<i>Enterobacter amnigenus</i>	-	+	-	-
<i>Enterobacter asburiae</i>	-	-	+	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	+	+
<i>Enterobacter sakasaki</i>	-	-	+	+
<i>Pantoea</i> sp.	+	-	-	-
<i>Pasteurella multocida</i>	-	-	+	-
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	-	-	+	-
<i>Providencia stuartii</i>	-	-	+	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	+	+	-
<i>Pseudomonas putida</i>	+	-	-	-
<i>Ralstonia pickettii</i>	+	-	-	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	-	-	+	-
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	-	+	+	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	+	+	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	+	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	-	-	+	-
Espécie não identificada (n=5)	+	+	-	+
Total:	7	10	20	6

Legenda: Aa (água abastecimento); Tq (água tanque); Ms (muco superfície); Ci (conteúdo intestinal); (+) isolado, (-) não isolado.

Já o sistema 3 (tanque de terra + adubo orgânico) apresentou menor diversidade de espécies n=21 (Tabela 5). Divergindo dos demais sistemas, o sistema 3 apresentou maior diversidade de espécies na água de abastecimento, seguido por conteúdo intestinal, muco de superfície e água do tanque. Do total dos microambientes, quatro espécies não foram passíveis de identificação, essas oriundas da água de abastecimento e muco de superfície. Aeromonadaceae foi a família bacteriana com maior diversidade de espécies.

TABELA 5 Diversidade de espécies gram-negativas isoladas no sistema tanque de terra + adubo orgânico

Espécies:	Aa	Tq	Ms	Ci
<i>Aeromonas caviae</i>	-	-	+	-
<i>Aeromonas eucrenophila</i>	+	-	+	+
<i>Aeromonas hydrophila</i>	+	+	+	+
<i>Aeromonas jandaei</i>	-	-	+	+
<i>Aeromonas media</i>	-	-	-	+
<i>Aeromonas schubertii</i>	-	-	-	+
<i>Aeromonas</i> sp.	+	+	+	+
<i>Aeromonas trota</i>	-	-	-	+
<i>Alcaligenes faecalis</i>	-	+	+	-
<i>Chromobacterium violaceum</i>	+	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+
<i>Klebsiella ozaenae</i>	+	-	-	-
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	-	-	-	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	+	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	+	-	-	-
<i>Shewanella putrefaciens</i>	-	-	+	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	-	+	-
<i>Vibrio vulnificus</i>	-	+	-	-
<i>Wautersia paucula</i>	+	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	+	-	-	-
Espécie não identificada (n=4)	+	-	+	-
Total:	11	5	8	8

Legenda: Aa (água abastecimento); Tq (água tanque); Ms (muco superfície); Ci (conteúdo intestinal). (+) isolado, (-) não isolado.

Apesar das diferenças do manejo e do tipo de alimentação nos sistemas analisados, não houve variação na diversidade microbiana analisada.

No muco de superfície, microambiente, houve maior isolamento de bactérias. O gênero *Aeromonas* foi predominante, composto majoritariamente pela espécie *Aeromonas hydrophila*. O muco é composto por lisozimas e imunoglobulinas que funcionam como barreira imunológica contra microrganismos. Normalmente, são encontrados baixos números de bactérias, pois, ao mesmo tempo em que apresenta uma barreira imunológica, o muco de superfície possui viscosidade, pela qual os microrganismos são atraídos e aderidos. Devido à metodologia empregada, a rinsagem, ou lavagem superficial, pode ter ocorrido um contato maior entre brânquia e muco de superfície com a rinsagem, pois ambos formaram apenas um microambiente.

Carneiro (2005), avaliando a densidade de populações bacterianas nos mesmos sistemas de cultivo analisados, demonstrou que o sistema com adubação orgânica apresentou maior número de bactérias totais ($P \leq 0,05$).

Esperava-se que com o uso da adubação orgânica, houvesse maior número de isolamento de membros da família Enterobacteriaceae o que não ocorreu, quando comparado aos sistemas 1 e 2. No sistema 3, não houve alteração da diversidade de espécies gram-negativas, em função do adubo utilizado.

Considera-se que a microbiota associada aos animais presente, sobre determinadas condições, potencial patogênico para os hospedeiros. Os dados da Tabela 6 apresentam o potencial patogênico de bactérias gram-negativas isoladas de sistemas de cultivo de tilápia-do-Nilo. Constatou-se a presença de microrganismos não patogênicos, potencialmente patogênicos ou, ainda, com potencial patogênico não determinado, tanto para peixes quanto para seres humanos. Entretanto, pode-se salientar que a alteração no meio aquático irá provocar situação de estresse, um dos fatores mais importantes no

desencadeamento do processo saúde-doença em peixes. O pescado pode veicular ampla variedade de microrganismos patogênicos para os seres humanos, sendo a maior parte deles fruto da contaminação ambiental.

TABELA 6 Potencial patogênico de bactérias gram-negativas isoladas de sistemas de cultivo de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Espécies:	Peixes	Seres humanos	Fonte
<i>Aeromonas caviae</i>	X	X	(OMS, 2003)
<i>Aeromonas eucrenophila</i>	X	-	(OMS, 2003)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	X	X	(Janda & Abbott, 1998)
<i>Aeromonas jandaei</i>	-	X	(OMS, 2003)
<i>Aeromonas media</i>	X	-	(Gu & Mitchell, 2002)
<i>Aeromonas schubertii</i>	X	X	(OMS, 2003)
<i>Aeromonas</i> sp.	X	X	(Novotny et al., 2004)
<i>Aeromonas trota</i>	X	X	(Novotny et al., 2004)
<i>Aeromonas veronii</i> bt <i>sobria</i>	X	X	(OMS, 2003)
<i>Alcaligenes faecalis</i>	-	X	(Williamson et al., 1999)
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	-	X	(Gilad et al., 2000)
<i>Burkholderia cepacia</i>	-	X	(Loutet et al., 2006)
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	-	X	(Wiersinga et al., 2006)
<i>Chromobacterium violaceum</i>	-	X	(Martinez et al., 2000)
<i>Citrobacter freundii</i>	X	-	(Aydin et al., 1997)
<i>Citrobacter koseri</i>	-	X	(Cassidy et al., 2002)
<i>Enterobacter amnigenus</i>	X	X	(Halda-Alija, 2004)
<i>Enterobacter asburiae</i>	X	-	(Halda-Alija, 2004)
<i>Enterobacter cloacae</i>	X	-	(Halda-Alija, 2004)
<i>Enterobacter sakasakii</i>	X	X	(Iversen, 2004)
<i>Escherichia coli</i>	-	X	(Novotny et al., 2004)
<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	-	X	(Kansouzidou et al., 2000)
<i>Hafnia alvei</i>	X	X	(Padilla, 2005)
<i>Klebsiella ozaenae</i>	X	X	(Halda-Alija, 2004)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	X	X	(Halda-Alija, 2004)
<i>Pantoea</i> sp.	-	X	(Baere et al., 2004)
<i>Pasteurella multocida</i>	-	X	(Steenbergen et al., 2005)
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	X	X	(Rey et al., 2003)
<i>Providencia stuartii</i>	-	X	(Aubert et al., 2005)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	X	-	(Lewbart, 2001)
<i>Pseudomonas putida</i>	X	-	(Lewbart, 2001)

“...continua...”

“TABELA 6, Cont.”

<i>Pseudomonas luteola</i>	-	X	(Casalta et al., 2005)
<i>Ralstonia pickettii</i>	-	-	(Hundt, 1998)
<i>Serratia liquefaciens</i>	X	-	(Vigneulle, 1995)
<i>Serratia plymuthica</i>	X	-	(Vigneulle, 1995)
<i>Shewanella putrefaciens</i>	X	-	(Kozinska, 2004)
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	-	-	(Singh et al., 2003)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	X	(Williamson et al., 1999)
<i>Vibrio vulnificus</i>	X	X	(Novotny et al., 2004)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	X	-	(Tennant et al., 2003)
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	-	X	(Tennant et al., 2003)
<i>Wautersia paucula</i>	-	X	(Vandamme et al., 1999)

Legenda: X (Potencialmente patogênica)

- (Não patogênica ou potencial patogênico não determinado).

Relatos prévios da literatura (Al-Harbi & Uddin, 2005; Miranda & Zemelman, 2002a; Nedoluga & Westhoff, 1997), em diversos ambientes diferentes, não demonstraram uma diversidade de bactérias da mesma magnitude ou proporção observada nesse experimento. Contudo, Edwards et al. (2001), avaliando a diversidade da microbiota bacteriana em lagoa eutrofizada, demonstraram a predominância de bactérias gram-negativas, havendo maior isolamento dos gêneros *Aeromonas* e *Pseudomonas*. Tais resultados foram similares quanto à diversidade de espécies bacterianas identificadas nesse experimento. Isso pode ser devido à temperatura nas regiões tropicais, sendo todas as espécies identificadas tipicamente microrganismos psicrótrópicos e mesófilos.

4.2 Perfil de resistência a antimicrobianos

O perfil de resistência das amostras oriundas dos sistemas de cultivo 1, 2 e 3 aos antimicrobianos testados foi determinado em relação a espécies bacterianas, como pode ser observado na Tabela 7. Dentre as 43 espécies bacterianas identificadas, 95% apresentaram índice MAR igual ou acima de 0,2,

o que caracteriza múltipla resistência. Quanto à análise de múltipla resistência, as espécies analisadas apresentaram grande variação de índice MAR de 0 a 0,8. Os antimicrobianos eritromicina, ampicilina e cefuroxima foram, respectivamente, os que apresentaram maiores números de espécies resistentes nos sistemas analisados. Dados semelhantes foram obtidos por Miranda & Zemelman (2002), avaliando o perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias oriundas de fazendas de salmão no Chile. No mesmo trabalho, os autores observaram menores números de amostras resistentes para cloranfenicol e florfenicol, apresentando dados semelhantes aos obtidos no presente trabalho, especificamente com relação ao florfenicol que, juntamente a norfloxacin e a gentamicina, foi o antimicrobiano que apresentou menores números de amostras resistentes nos sistemas analisados.

As amostras oriundas dos diferentes sistemas de cultivo analisados apresentaram perfil de resistência semelhante, com média do índice MAR=0,41. A resistência mediada por elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons conjugativos, é muito comum para β -lactâmicos, macrolídeos e aminoglicosídeos (Takeuchi et al., 2005; Zhao et al., 2003). Assim, é possível a transferência de genes bacterianos de resistência a ampicilina, eritromicina e cefuroxima nos sistemas de cultivo analisados. Trabalho realizado por Carneiro (2005), avaliando a densidade de populações bacterianas nos mesmos sistemas de cultivo analisados no presente trabalho, apresentou alta densidade bacteriana no sistema 3 ($P \leq 0,05$), seguido pelo sistema 1, tendo sido mais baixa no sistema 2 ($P < 0,01$). Isso pode favorecer a troca de genes que codificam mecanismos de resistência a esses antimicrobianos entre membros da microbiota e bactérias patogênicas, tanto para mamíferos como para peixes.

As espécies com maiores índice de MAR (0,8) foram *Pseudomonas fluorescens*, *Flavimonas oryzihabitans* e *Ralstonia pickettii*. Demais membros da família Pseudomonadaceae, com exceção da espécie *Pasteurella multocida*,

apresentaram perfil de resistência (MAR=0,7) (Tabela 7). Estas espécies são filogeneticamente identificadas como pertencentes a membros da família Pseudomonadaceae.

Considerando como critério de múltipla resistência $MAR \geq 0,2$, conclui-se que a microbiota isolada nos sistemas de cultivo de tilápia é tipicamente multirresistente. 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 7 Frequências de múltipla resistência a antimicrobianos de isolados de espécies bacterianas oriundos de sistemas de cultivo de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Espécies	Antibióticos										MAR (%)	
	NOR	TET	ERI	CFX	CLO	FLF	AMP	GEN	SUL	NIT		
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
<i>Citrobacter freundii</i>	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	0,1
<i>Aeromonas caviae</i>	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	0,2
<i>Serratia plymuthica</i>	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	0,2
<i>Shewanella putrefaciens</i>	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	0,2
<i>Aeromonas veronii</i> bt sobria	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	0,2
<i>Klebsiella ozaenae</i>	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	0,2
<i>Yersinia enterocolitica</i>	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	0,2
<i>Pantoea</i> sp.	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	0,2
<i>Enterobacter amnigenus</i>	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	0,2
<i>Providencia stuartii</i>	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	0,2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	0,2
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	S	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S	0,3
<i>Aeromonas jandaei</i>	S	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S	0,3
<i>Enterobacter asburiae</i>	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	0,3
<i>Serratia liquefaciens</i>	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	0,3
<i>Aeromonas media</i>	S	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S	0,3
<i>Citrobacter koseri</i>	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S	0,3
<i>Escherichia coli</i>	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S	0,3
<i>Aeromonas trota</i>	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S	0,3
<i>Aeromonas schubertii</i>	S	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	0,3

“...continua...”

“TABELA 7, cont.”

Espécies	Antibióticos										MAR (%)
	NOR	TET	ERI	CFX	CLO	FLF	AMP	GEN	SUL	NIT	
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	0,3
<i>Rhanella aquatilis</i>	S	S	R	R	S	S	R	S	R	S	0,4
<i>Aeromonas eucrenophila</i>	S	S	R	R	S	S	R	S	R	S	0,4
<i>Aeromonas</i> sp.	S	S	R	S	S	S	R	R	R	S	0,4
<i>Aeromonas hydrophila</i>	S	R	R	S	S	S	R	S	R	S	0,4
<i>Vibrio vulnificus</i>	S	R	R	R	S	S	R	S	S	S	0,4
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	S	R	R	S	S	S	R	R	R	S	0,5
<i>Alcaligenes faecalis</i>	S	S	R	R	R	S	R	S	S	R	0,5
<i>Enterobacter sakasakii</i>	S	R	R	R	R	S	R	S	S	S	0,5
<i>Enterobacter cloacae</i>	S	R	R	R	S	S	R	S	S	R	0,5
<i>Chromobacterium violaceum</i>	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	0,5
<i>Hafnia alvei</i>	S	R	R	R	R	S	R	S	S	R	0,6
<i>Pseudomonas putida</i>	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	0,7
<i>Burkholderia cepacia</i>	S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	0,7
<i>Pseudomonas luteola</i>	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	0,7
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	0,7
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	0,7
<i>Pasteurella multocida</i>	S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	0,7
<i>Wautersia paucula</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	0,7
<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	0,8
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	0,8
<i>Ralstonia pickettii</i>	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	0,8

Legenda: Antibióticos testados: norfloxacina (NOR), tetraciclina (TET), eritromicina (ERI), cefuroxima (CFX), cloranfenicol (CLO), florfenicol (FLF), ampicilina (AMP), gentamicina (GEN), sulfonamidas (SUL), nitrofurantoína (NIT), Sensível ao antimicrobiano (S) e resistente ao antimicrobiano (R); MAR (múltipla resistência antibióticos).

As amostras isoladas nos sistemas de cultivo 1, 2 e 3 apresentaram alta frequência de resistência, similar à da eritromicina, ampicilina, cefuroxima, tetraciclina nitrofurantoína, cloranfenicol e sulfonamidas. Gentamicina, florfenicol e norfloxacina apresentaram menor resistência respectivamente às amostras testadas (Figura 1). Como pode ser observado houve uma tendência similar de frequência de resistência aos antibióticos nos três sistemas analisados, o que sugere que o manejo e nutrição diferenciados não influenciaram na seleção de bactérias resistentes.

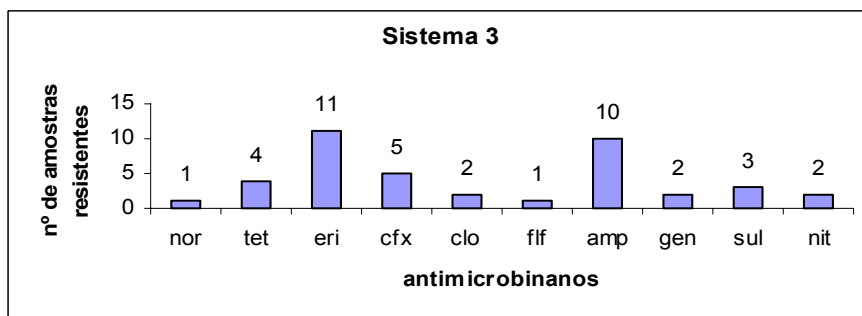
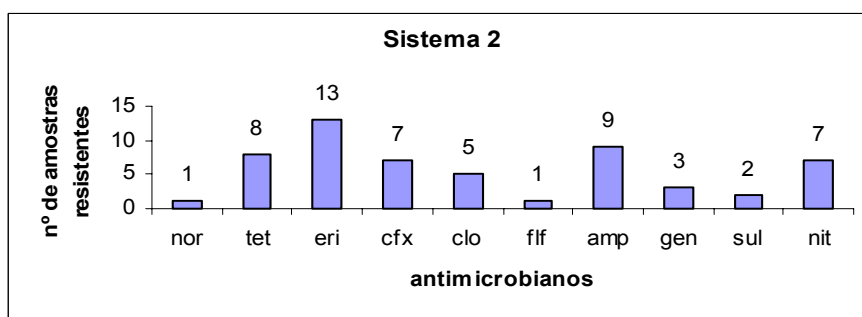
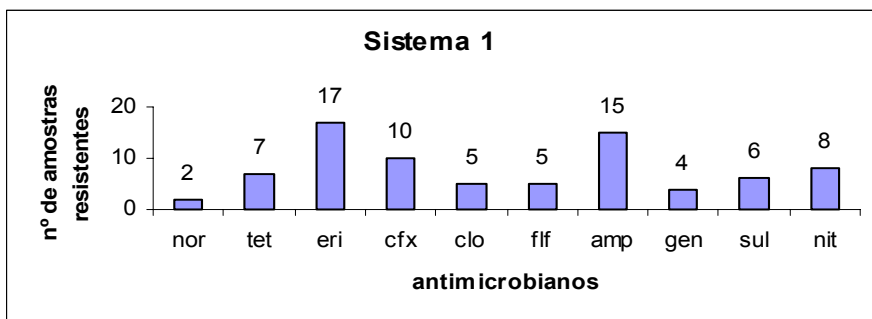


FIGURA 1 Frequência de múltipla resistência a antimicrobianos em sistemas de cultivo de tilápia. Sistema 1: 17 amostras; Sistema 2: 15 amostras e Sistema 3: 11 amostras. Antibióticos testados: norfloxacina (NOR), tetraciclina (TET), eritromicina (ERI), cefuroxima (CFX), cloranfenicol (CLO), florfenicol (FLF), ampicilina (AMP), gentamicina (GEN), sulfonamidas (SUL), nitrofurantoína (NIT).

5 CONCLUSÕES

Para os três sistemas de cultivo analisados, obteve-se uma diversidade de 43 espécies de bactérias gram-negativas.

A diversidade de espécies foi semelhante nos três sistemas de cultivo analisados, com predominância de bactérias dos gêneros *Aeromonas*, *Enterobacter* e *Pseudomonas*.

A microbiota caracterizada para os três sistemas de cultivo foi tipicamente multirresistente aos antibióticos.

O manejo e a nutrição diferenciados entre os sistemas analisados não influenciaram na seleção de espécies bacterianas e de perfil de resistência aos antibióticos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AYDIN, S.; CELEBI, S.; AKYURT, I. Clinical and pathological investigation of *Citrobacter freundii* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences**, Ankara, v. 21, n. 6, p. 497-501, 1997.

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.

AL-HARBI, A. H.; UDDIN, N. Bacterial diversity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in brackish water in Saudi Arabia. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 250, n. 3/4, p. 566-572, Dec. 2005.

AUBERT, D.; NAAS, T.; FRÉDÉRIQUE, M.; NORDMANN, P. Novel Genetic Structure Associated with an Extended-Spectrum β -Lactamase *bla_{VED}* Gene in a *Providencia stuartii* Clinical Isolate from Algeria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 49, n. 8, p. 3590-3592, Aug. 2005.

BAERE, T. D.; VERHELST, R.; LABIT, C.; VERSCHRAEGEN, G.; WAUTERS, G.; CLAEYS, G.; VANECHOUTTE, M. Bacteremic Infection with *Pantoea ananatis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 9, p. 4393-4395, Sept. 2004.

BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. 9. ed. Baltimore: Willians & Willians, 1984. 787 p.

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.

BOSCOLOL, W. R.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M.; FURUYA, M.; MEUER, F. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum, nas fases inicial e

de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa**, v. 30 n. 5, p. 1391-1396, set./out. 2001.

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.

CARNEIRO, D. O. **Avaliação e caracterização de populações bacterianas resistentes a antibióticos isoladas em diferentes sistemas de cultivo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2005. 60 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CARNEIRO, P. C. F.; CYRINO, J. E. P.; CASTANGNOLLI, N. Produção da tilápia vermelha da Flórida em tanques-rede. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, n. 3, p. 673-680, jul./set. 1999.

CASALTA, J. P.; FOURNIER, P. E.; HABIB, G.; RIBERI, A.; RAOULT, D. Prosthetic valve endocarditis caused by *Pseudomonas luteola*. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 5, n. 82, p. 1-3, Oct. 2005.

CASSIDY, J. P.; CALLANAN, J. J.; MCCARTHY, G.; O'MAHONY, M. C. Myocarditis in Sinbling Boxe Puppies Associated with *Citrobacter koseri* Infection. **Veterinary Pathology**, Lawrence, v. 39, n. 3, p. 393-395, May 2002.

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

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for antimicrobial disk susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals**. Pennsylvania, USA, 2006. v. 26, n. 23. Replaces M42-p.

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.

EDWARDS, M. L.; LILLEY, A. K.; WILSON, T. H. T.; THOMPSON, I. P.; COOPER, I. Characterisation of the culturable heterotrophic bacterial community in a small eutrophic lake (Priest Pot). **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 35, n. 3, p. 295-304, May 2001.

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.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Estados Unidos, 2006.

FIRETTI, R.; SALES, D. S. O futuro promissor da cadeia produtiva da piscicultura comercial. **AnualPec2004**, p. 305-307.

GILAD, J.; BORER, A.; PELED, N.; RIESENBERG, K.; TAGER, S. APPELBAUM, A. SCHLAEFFER, F. Hospital-acquired *Brevundimonas vesicularis* septicemia following open-heart surgery: Case report and literature review. **Scandinavian Journal of Infections Diseases**, Oslo, v. 32, n. 1, p. 90-91, 2000.

GU, J. D.; MITCHELL, R. Indigenous microflora and opportunistic pathogens of the freshwater zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 474, n. 1/3, p. 81-90, Apr. 2002.

HALDA-ALIJA, L. Incidence of antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* species in freshwater wetlands. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 39, n. 5, p. 445-450, 2004.

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.

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**, Oxford, v. 38, n. 3, p. 255-266, Mar. 2003.

HUNDT, K.; WAGNER, M.; BECHER, D.; HAMMER, E.; SCHAUER, F. Effect of Selected Environmental Factors on Degradation and Mineralization of

Biaryl Compounds by the Bacterium *Ralstonia Picketti* in Soil and Compost. **Chemosphere**, Oxford, v. 36, n. 10, p. 2321-2335, Apr. 1998.

IVERSEN, C.; WADDINGTON, M.; ON, L. W.; FORSYTHE, S. Identification and Phylogeny of *Enterobacter sakazakii* Relative to *Enterobacter* and *Citrobacter* Species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 11, p. 5368-5370, Nov. 2004.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama os species, diseases presentations, and unanswered questions. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 27, n. 2, p. 332-344, 1998.

LEWBART, G. A. Bacterial and Ornamental Fish. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, Philadelphia, v. 10, n. 1, p. 45-56, Jan. 2001.

LOUTED, S. A.; FLANNAGAN, R. S.; KOOL, C.; SOKOL, P. A.; VALVANO, M. A. A Complete Lipopolysaccharide Inner Core Oligosaccharide Is Required for Resistance of *Burkholderia cenocepacia* to Antimicrobial Peptides an Survival In Vivo. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 188, n. 6, p. 2073-2080, Mar. 2006.

KANSOUZIDOU, A.; CHARITIDOU, C.; POUBROU, E.; DANILIDIS, V. D.; TSAGAROPOULOU, H. Haemorrhagic papular rash associated to *Flavimonas oryzihabitans* bacteraemia in child. **European Journal of Epidemiology**, Dordrecht, v. 16, n. 3, p. 277-279, Mar. 2000.

KOSINSKA, A.; PEKELA, A. First isolation of *Shewanella putrefaciens* from freshwater fish – a potential new pathogen of fish. **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, Amsterdam, v. 24, n. 4, p. 189-193, 2004.

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

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.

MACFADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacterias**. 2. ed. Baltimore, 1980. 527 p.

MARTINEZ, R.; VELLUDO, M. A. S.; SANTOS, V. R.; DINAMARCO, P. V. *Chromobacterium violaceum* Infection in Brazil. A Case Report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 111-113, 2000.

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. 8-14, 2002.

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.

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, p. 31-47, 2002b.

MELLO, S. C. R. P.; Pesca e aquicultura no Brasil: situação tecnológica e sanitária. 3 p. 2004. Disponível em:
<<http://www.abma.com.br/2004/notes/246.pdf>>. Acesso em: 11 jul. 2006.

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**, Belo Horizonte, v.21, n. 203, p. 62-64, 2000.

NEDOLUHA, P. C.; WESTHOFF, D. Microbiology of striped bass grown in three aquaculture systems. **Food Microbiology**, London, v. 14, n. 3, p. 255-264, July 1997.

NOVOTNY, L.; DVORSKA, L.; LORENCOVA, A.; BERAN, V.; PAVLIK, I. Fish: a potential source of bacterial pathogens for human beings. **Veterinarni Medicina**, Prague, v. 49, n. 9, p. 343-358, Sept. 2004.

ONO, E. A.; KUBITZA, F. **Cultivo de peixes em tanque-rede**. 3. ed. Jundiaí, 2003. 112 p.

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

PACHECO, D. O peixe de ouro da aquicultura. Revista Nacional da Carne. n. 325, março 2004. Disponível em: <http://www.acaq.org.br/noticias/2004/not-26_04_2004_c.htm>. Acesso em: 03 abr. 2006.

PADILLA, D.; REAL, F.; GÓMEZ, V.; SIERRA, E.; ACOSTA, B.; DÉNIZ, S.; ACOSTA, F. Virulence factors and pathogenicity of *Hafnia Alvei* for gilthead seabream, *Sparus aurata* L. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 28, n. 7, p. 411-417, July 2005.

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* sp. and *Enterococcus* sp. 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.

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

REINA, J.; LOPEZ, A. Clinical and Microbiological Characteristics of *Rahnella aquatilis* Strains Isolated from Children. **Journal of Infection**, London, v. 33, n. 2, p. 135-137, Sept. 1996.

REY, C. G.; SVENSON, S. B.; ERIKSSON, L. M.; CIZNAR, I.; KROVACEK, K. Unexpected finding of the “tropical” bacterial pathogen *Plesiomonas shigelloides* from lake water north of the Polar Circle. **Polar Biology**, New York, v. 26, n. 8, p. 495-499, Aug. 2003.

RISSATO, D. A. **A indústria de beneficiamento de tilapias do Nilo no Estado do Paraná**: um estudo de sua organização industrial. 2001. 136 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba,

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

SINGH, R.; STINE, O.; SMITH, D. L.; SPITZNAGEL, J. K.JR.; LABIB. M. E.; WILLIAMS, H. N. Microbial Diversity of Biofilms in Dental Unit Water Systems. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 6, p. 3412-3420, June 2003.

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.

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.

STEENBERGEN, S. M.; LICHTENSTEIGER, C. A.; CAUGHLAN, R.; GARFINKLE, J.; FULLER, T. E.; VIMR, E. R. Sialic Acid Metabolism and Systemic Pasteurellosis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 3, p. 1284-1294, Mar. 2005.

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.

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.

TENNANT, S. M.; GRANT, T. H.; BROWNE, R. M. R. Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 38, n. 2, p. 127-137, Sept. 2003.

TORANZO, A. E.; BAYA, A. M.; ROMALDE, J.L. and Hetrick, F.M. Association of *Aeromonas sobria* with mortalities of adult gizzard shad, *Dorosoma cepedianum* Leseur. **Journal of Fisheries Diseases**, Oxford, v. 12, n. 5, p. 439-448, Sept. 1989.

VANDAMME, P.; GORIS, J.; COENYE, T.; HOSTE, B.; JANSSENS, D.; KERSTERS, K.; DE VOS, P.; FALSEN, E. Assignment of Centers of Disease Control group IV c-2 to genus *Ralstonia* as *Ralstonia paucula* sp. Nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 49, n. 2, p. 663-669, Apr. 1999.

VIGNEULLE, M.; LAURENCIN, F. B. *Serratia liquefaciens*: a case report in trout (*Scophthalmus maximus*) cultured in floating cages in France. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 132, n. 1/2, p. 121-124, Apr. 1995.

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**, Amsterdam, v. 76, n. 1/2, p. 165-168, June 2002.

WIERSINGA, W. J.; POLL, T. V.; WHITE, N. J.; DAY, N. P.; PEACOCK, S. J. Melioidosis: insights into the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*. **Nature Review Microbiology**, London, v. 4, n. 4, p. 272-282, Apr. 2006.

WILLIAMSON E. C. M.; MILLAR, M. R.; STEWARD, C. G.; CORNISH, J. M.; FOOT, A. B.; OAKHILL, A. Infections in adults undergoing unrelated donor bone marrow transplantation. **British Journal Haematology**, Oxford, v. 104, n. 3, p. 560-568, Mar. 1999.

WITTE, W. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 14, n. 4, p. 321-325, May 2000.

ZIMMERMANN, S.; FITZSIMMONS, K. Tilapicultura intensiva. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. São Paulo: TecART, 2004. p. 239-266.

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.