



Estado do Paraná

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - Unioeste**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS - PPGCA**

**Diversidade e perfil de resistência a antimicrobianos de  
bactérias isoladas em pisciculturas com diferentes  
densidades de estocagem**

**ÉDELA MARISA DOS SANTOS BOUFLEUER**

Toledo – Paraná – Brasil

2015



Estado do Paraná

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - Unioeste**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS - PPGCA**

## **Diversidade e perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas em pisciculturas com diferentes densidades de estocagem**

**ÉDELA MARISA DOS SANTOS BOUFLEUER**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste/*Campus* Toledo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientadora: Profa. Dra. Cleide Viviane Buzanello Martins

Co-orientador: Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli

AGOSTO/2015

Toledo – PR

Catálogo na Publicação elaborada pela Biblioteca Universitária UNIOESTE/Campus de Toledo.

Bibliotecária: Marilene de Fátima Donadel - CRB – 9/924

1.1 Boufleuer, Édela Marisa dos Santos

B757d Diversidade e perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas em pisciculturas com diferentes densidades de estocagem / Édela Marisa dos Santos Boufleuer. -- Toledo, PR : [s. N.], 2015.

73 f. : il. (algumas color.), figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Cleide Viviane Buzanello Martins

Coorientador: Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli

Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Campus de Toledo. Centro de Engenharias e Ciências Exatas.

1. Ciências ambientais - Dissertações 2. Peixe - Criação - Avaliação de densidade de estocagem 3. Peixe cultivado - Viveiros - Doenças 4. Peixes - Doenças bacterianas patogênicas 5. Contaminação ambiental I. Martins, Cleide Viviane Buzanello, orient. II. Bombardelli, Robie Allan, coorient. III. T

CDD 20. ed. 639.311

597.0929

FOLHA DE APROVAÇÃO

**ÉDELA MARISA DOS SANTOS BOUFLEUER**

“Diversidade e perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas em pisciculturas com diferentes densidades de estocagem.”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Ambientais – Nível de Mestrado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais, pela Comissão Examinadora composta pelos membros:

COMISSÃO EXAMINADORA



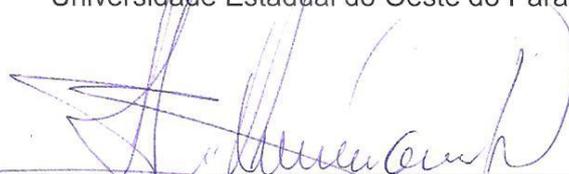
---

Profa. Dra. Cleide Viviane Buzanello Martins  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Presidente)



---

Profa. Dra. Fabiana Gisele da Silva Pinto  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná



---

Prof. Dr. Fábio Bittencourt  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Aprovada em: 13 de agosto de 2015.

Local de defesa: Auditório do GERPEL – UNIOESTE/campus de Toledo.

Dedico a minha família que é minha fortaleza!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e a oportunidade de mais uma jornada no plano terrestre para fazer cumprir minha missão e evoluir espiritualmente.

A minha Grande família que é o tesouro mais precioso que Deus me deixou. Em especial a meu Pai Jose Rudi, homem batalhador, que é minha fortaleza, minha querida e doce Mãe Graciolina, as minha maravilhosas irmãs Claudia e Cléa, simplesmente melhores amigas.

Ao meu grande amor Leocimar Viapiana pela compreensão e paciência, por estar presente a cada momento dessa fase.

A UNIOESTE pelo espaço e estrutura cedida para realização de todo o trabalho, ao Programa de Pós Graduação *Strictu Sensu* em Ciências Ambientais e toda a grande equipe que ajudaram o programa acontecer, proporcionando a realização de mais um desafio em minha vida.

A CAPES pela bolsa cedida durante o mestrado, para auxiliar na realização de todas as atividades envolvidas com o Programa.

A todos os Docentes do Programa que também se dedicaram a esse desafio, e conseguiram transmitir seus conhecimentos e experiências que valerão por toda a vida. Sou grata por todo o aprendizado que de alguma forma fez amplicar minha visão profissional.

Aos Professores fora do Programa que também auxiliaram em algum momento, pelo esclarecimento de dúvidas, pelas conversas, trabalhos em parcerias.

Agradeço a minha querida Orientadora, Professora Dra. Cleide Viviane Buzanello Martins, pela orientação, amizade, alegria, pelo apoio, por acreditar em mim, incentivar-me, e me propor mais desafios no dia-adia. Sou muito grata a você!

Ao meu Co-orientador Professor Dr. Robie Allan Bombardelli, pelo auxílio principalmente nas áreas que não tinha experiência, agradeço pelas aconversas e apoio.

Ao Professor Dr.Pitágoras Piana, pela grande ajuda nas análises estatísticas deste trabalho, me proporcionando novos conhecimentos.

Agradeço ao Engenheiro de Pesca Cleiton Manke, por todo o auxílio que me deu na escolhas das propriedades, nas coletas, por tirar todas as dúvidas que tive.

A Sirlei e ao Laboratório Cedro de São Luíz – Maranhão, onde foi realizada toda a identificação das minhas amostras microbiológicas. Muito obrigada pela atenção, disponibilidade, esclarecimento.

Ao Fernando, técnico do laboratório de microbiologia da UNIOESTE, excelente pessoa, auxiliando no desenvolvimento do experimento.

Agradeço a Natiely por estar ao meu lado, ajudando na realização do trabalho, na parceria, companhia. Obrigada querida!

Aos todos meus amigos, companheiros de laboratório, colegas do mestrado que estiveram por perto a cada momento, auxiliando nas dúvidas, colocando a mão na massa, fazendo companhia. Foi muito importante a presença de cada um, já que por algum tempo a Universidade foi minha moradia e vocês minha família . Agradeço muito pela contribuição de vocês neste trabalho.

A minha amiga Cristina Rucker, pela amizade desde o começo do mestrado, pelos trabalhos em parceria, pelo auxílio nas dúvidas,

A Grande amiga e companheira Eliete, amizade que se deu não só dentro, mas fora do mestrado. Obrigada pelas conversas, companhia.

Ao João, pela companhia e amizade

A todos os demais que não citei mas que com certeza contribuíram de alguma forma especial e deixaram um pedacinho de suas vidas, experiências, na minha memória.

A todos que direta ou indiretamente participaram desse trabalho e de minha formação ajudando a contruir com mais um pedaço da minha história.

Muito obrigada!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>11</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>12</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>13</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>12</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	12
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO .....	12
2.3 JUSTIFICATIVA.....	12
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>13</b>
3.1 AQUICULTURA.....	13
3.2 PISCICULTURA NO BRASIL .....	14
3.3 SISTEMAS DE CULTIVO .....	15
3.3.1 Extensivo .....	15
3.3.2 Semi-intensivo .....	16
3.3.3 Intensivo .....	16
3.3.4 Superintensivo .....	17
3.4 QUALIDADE DA ÁGUA .....	18
3.5 DIVERSIDADE MICROBIANA AQUÁTICA.....	19
3.6 ANTIMICROBIANOS .....	21
3.7 USO DE ANTIMICROBIANOS NA PRODUÇÃO ANIMAL.....	25

3.8	RESISTÊNCIA MICROBIANA A ANTIMICROBIANOS .....	28
3.9	RESISTÊNCIA MICROBIANA A ANTIMICROBIANOS NO MEIO AQUÁTICO	30
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>32</b>
4.1	ÁREA DO ESTUDO.....	32
4.2	SELEÇÃO DAS PROPRIEDADES .....	33
4.3	COLETA E TRANSPORTE DAS AMOSTRAS .....	35
4.4	QUALIDADE FÍSICA E QUÍMICA DA ÁGUA.....	35
4.5	ISOLAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DAS POPULAÇÕES BACTERIANAS ..	36
4.6	IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS.....	36
4.7	DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS ..	37
4.8	DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE MÚLTIPLA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS .....	37
4.9	ANÁLISE DOS DADOS .....	38
4.9.1	QUALIDADE DA ÁGUA .....	38
4.9.2	QUANTIFICAÇÃO DAS POPULAÇÕES BACTERIANAS .....	38
4.9.3	DIVERSIDADE BACTERIANA.....	38
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
5.1	QUALIDADE DA ÁGUA .....	39
5.2	CONTAGEM TOTAL DE MESÓFILOS HETEROTRÓFICOS .....	45
5.3	DIVERSIDADE BACTERIANA NAS DIFERENTES DENSIDADES DE ESTOCAGEM.....	47
5.4	PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS.....	54

5.5	PERFIL DE MÚLTIPLARRESISTÊNCIA .....	57
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>61</b>
7	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>62</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ACP</b>	Análise de Componentes Principais
<b>Cond</b>	Condutividade Elétrica
<b>CLSI</b>	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
<b>DBO</b>	Demanda Química de Oxigênio
<b>DQO</b>	Demanda Bioquímica de Oxigênio
<b>PT</b>	Fosfato Total
<b>MALDI –TOF</b>	Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz - Tempo-de-Vôo/Espectrômetro de Massa
<b>MAR</b>	Índice de Multipla Resistência
<b>MC</b>	Mac Conkey
<b>MH</b>	Müeller Hinton
<b>MO</b>	Matéria Orgânica
<b>NH<sub>4</sub></b>	Amônia
<b>NO<sub>2</sub></b>	Nitrito
<b>OD</b>	Oxigênio Dissolvido
<b>SNP</b>	Genotipagem de Polimorfismo de Nucleotídeo Único
<b>Temp</b>	Temperatura
<b>TSA</b>	Ágar Soja Trypticaseína

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa do Estado do Paraná com destaque no município de Maripá.....	32
Figura 2 - Pisciculturas localizadas na área rural do município de Maripá – PR, destacando os viveiros selecionados. 1: densidade de estocagem de 4 peixes por metro <sup>2</sup> , 2: densidade de estocagem de 8 peixes por metro <sup>2</sup> e 3: densidade de estocagem de 10 peixes por metro <sup>2</sup> . .....	34
Figura 3 - Médias e intervalo de 95% de confiança para os componentes principais que sumarizaram as variáveis físicas e químicas da água. Variáveis associadas aos componentes são apresentadas próximas ao eixo. A) relação significativa entre o primeiro componente principal (CP1) e o fator local*; B) relação significativa entre o segundo componente principal (CP2) e o fator local*; C) relação significativa entre o terceiro componente principal (CP3) e o fator local* e; D) relação significativa entre o terceiro componente principal (CP2) e o fator densidade. Letras minúsculas diferentes indicam médias distintas pelo teste de Tukey (p < 0,05).....	41
Figura 4 - Quantidade de bactérias observada nos tanques de cultivo com três diferentes densidades de estocagem de peixes. Médias ± 95% de intervalo de confiança das quantidades transformados em raiz quadrada.Letras distintas indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey (p < 0,05). .....	46
Figura 5 - Diagrama de ordenação pelo método de escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) (stress=15,5). .....	54

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Mecanismos de ação e espectros de atividade dos agentes antimicrobianos. ....	22
Tabela 2 - Principais antimicrobianos utilizados na aquicultura mundial e a importância na medicina humana.....	24
Tabela 3 - Correlações entre as variáveis mensuradas nos quatro locais dos nove tanques com os componentes principais (CP) gerados a partir da análise de .....	40
Tabela 4 - Valores médios e erro padrão das variáveis físicas e químicas mensuradas em pisciculturas de diferentes densidades de estocagem. ....	45
Tabela 5 - Diversidade e frequência de espécies bacterianas obtidas de diferentes densidades de estocagem de piscicultura. ....	49
Tabela 6 - Frequência e Gram das famílias bacterianas em 407 isolados de diferentes densidades de estocagem de piscicultura. ....	53
Tabela 7 - Frequência de resistência frente a antimicrobianos nos isolados microbianos, oriundos das amostras de água das diferentes densidades de estocagem. ....	55
Tabela 8 - Perfil de resistência a antimicrobianos das famílias representantes dos isolados bacterianos, oriundos das amostras de água das diferentes densidades de estocagem. ...	56
Tabela 9 - Perfil de múltipla resistência a antimicrobianos nos isolados microbianos, oriundos das amostras de água das diferentes densidades de estocagem. ....	58

## RESUMO

BOUFLEUER, É. M. S. Diversidade e perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas em pisciculturas com diferentes densidades de estocagem. 13 de Agosto de 2015. 73 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Toledo, 2015.

O trabalho teve o objetivo de caracterizar a diversidade bacteriana e o perfil de resistência a antimicrobianos em pisciculturas com diferentes densidades. Foram coletadas amostras de água em quatro pontos (montante, entrada, saída e jusante) de viveiros de três pisciculturas, cada uma composta por uma densidade de estocagem diferente (4 peixes/m<sup>2</sup>, 8 peixes/m<sup>2</sup> e 10 peixes/m<sup>2</sup>). Os parâmetros analisados para qualidade da água foram oxigênio dissolvido, temperatura, pH, condutividade elétrica, pH, fósforo, amônia, demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO) e matéria orgânica. Também foram isolados e feito a contagem total de bactérias mesófilas heterotróficas. Posteriormente, foi realizada a identificação das espécies isoladas, em seguida submetidas a análise qualitativa do perfil de resistência frente a sete antibióticos comercial. O conjunto de variáveis físicas e químicas foi sumarizado em 3 componentes principais pela análise de componentes principais (ACP). No primeiro componente principal (amônia, fósforo, matéria orgânica e temperatura da água e oxigênio dissolvido) foi identificado valores superiores dentro do viveiro, ao passo que o oxigênio dissolvido foi superior a jusante. O segundo componente principal (nitrito), apresentou diferença em relação ao interior dos viveiros, sendo superior a jusante. Interação entre locais e densidade, bem como efeito principal da densidade não foram significativos no dois primeiros componentes. Já o terceiro componente (condutividade elétrica) variou significativamente entre os locais, observando que foi inferior a montante, sofreu uma elevação significativa no interior dos viveiros e passou a um valor intermediário a jusante. Para as densidades, a condutividade elétrica foi superior nos tanques que apresentaram maiores concentrações de peixes. Dos 407 isolados, identificou-se 55 espécies bacterianas pertencentes a 11 famílias distintas. A família Enterobacteriaceae foi a que predominou dentre as densidades avaliadas, seguida da alcaligenaceae. A densidade de estocagem 4 peixes/m<sup>2</sup> apresentou diferenças estatísticas significativa, com menor frequência de famílias. Observou-se elevado número de bactérias resistentes principalmente à ampicilina e eritromicina, enquanto que menos de 15% dos isolados foram resistentes a gentamicina e cloranfenicol. Dentre os isolados analisados, 96% apresentaram índice de múltipla resistência a antimicrobianos (MAR) maior ou igual a 0,2. A intensificação dos sistemas promoveu o aumento da concentração bacterianas, sem relação com as variáveis físicas e químicas, foi identificado uma diversidade de espécies bacterianas e houve alto índice de resistência e multirresistência aos antimicrobianos testados.

**Palavras-chave:** Intensificação aquícola; contaminação ambiental; patógenos; doenças.

## ABSTRACT

BOUFLEUER, É. M. S. Diversity and antimicrobial resistance profile of isolated bacteria in fish breeding with different stocking densities. 13 de Agosto 2015. 74 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Toledo, 2015.

The work aimed to characterize the bacterial diversity and profile of antimicrobial resistance in fish breeding with different densities. Water samples were collected in four points (amount, input, output, and downstream) of nurseries of three fish breeding, each composed of a different stocking density (4 fish by squared meter, 8 fish by squared meter, 10 fish by squared meter). The parameters analyzed to determine water quality were dissolved oxygen, temperature, water pH, electrical conductivity, phosphorus, ammonia, biochemical oxygen demand, chemical oxygen demand and organic matter. Heterotrophic mesophilic bacteria were isolated as well as their total amount was determined. Subsequently, the identification of isolated species was carried out and then subjected to qualitative analysis of front resistance profile to seven commercial antibiotics. The set of physical and chemical variables were summarized in three main components by main component analysis. In the first main component (ammonia, phosphorus, organic matter, water temperature and dissolved oxygen), there was a greater amount in the breeding ground than what was expected, whereas the dissolved oxygen was higher than downstream. The second main substance (nitrite) showed a difference if compared to the inside of the breeding grounds, being higher than downstream. The interaction between breeding sites and densities, as well as the main density effect were not significant in the first two components. The third component (electrical conductivity) varied significantly between the sites, making it possible to notice that the amount was lower, and it experienced a significant raise inside the breeding ground and went on to an intermediate value downstream. Concerning the values of density, it was possible to realize that the electrical conductivity was higher in the tanks which had the highest concentration of fish. From the 407 that were isolated, 55 bacterial species were recognized and identified, being part of eleven different families. The Enterobacteriaceae family was the one that prevailed among the evaluated densities, followed by Alcaligenaceae. The stocking density of 4 fish by squared meter presented significant statistical differences, with lower frequency of families. A great amount of resistant bacteria was observed, and their resistance was mainly to ampicillin and erythromycin, while fewer than 15% of the isolated were resistant to chloramphenicol and gentamicin. Among the isolated that were analyzed, 96% showed multiple antimicrobial resistance index higher or equal 0,2. The intensification of systems promoted the increase of bacteria concentration, there wasn't relation to the physical and chemical variables was identified a variety of bacterial species and there was high rate of resistance and multidrug resistance to antimicrobials tested.

**Keywords:** Aquaculture Intensification; environmental contamination; pathogens; diseases.

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização dos recursos naturais para satisfazer as necessidades do homem aumenta cada vez mais, em virtude do crescimento demográfico que embala a produção (BARROS e AMIM, 2008). A água é um dos recursos naturais mais importantes e vital para todos os ecossistemas. Os rios, por sua vez, são as principais fontes de água para o consumo humano e animal (GOÑI-URRIZA, 2000).

Uma das principais discussões global na atualidade é a degradação ambiental por diversos contaminantes, que apresentam sérias conseqüências para saúde humana e animal. Em especial, a contaminação do ambiente por medicamentos tanto na água como no solo, que é uma das preocupações em grande parte do mundo (EICKHOFF, HEINECK e SEIXAS, 2009). Dessa forma, a degradação, o agravamento da poluição e a carência de água, junto com a execução de atividades incompatíveis, têm demandado um maior planejamento e manejo desses recursos (CASTILHO, PEREIRA, PIE, 2008).

A piscicultura é uma atividade de natureza econômica que apresenta forte e rápido crescimento, trazendo alta lucratividade para o país, geração de empregos e fornecimento de alimento para boa parte da população (CREPALDI et al., 2007). Porém é considerada como fonte de elevada poluição, sendo tratada com relevância nos últimos anos (NEU, 2014).

Apesar de contribuir para o aumento da produção piscícola, o fornecimento de matéria orgânica em excesso pode contribuir para a diminuição da qualidade da água e em consequência disso, a queda no rendimento e a qualidade dos animais cultivados (ALVES et al., 2006). Isso faz com que haja disseminação e manutenção de micro-organismos, entre esses, os nocivos a saúde humana e animal.

A microbiota aquática é muito diversificada e está intimamente ligada aos aspectos físicos e químicos do ambiente. Vários destes micro-organismos fazem parte da microbiota associada ao peixe como oportunistas e quando há um desequilíbrio no sistema, diversas doenças são desencadeadas. Dentre a microbiota aquática são encontrados patógenos humanos e quanto mais contaminado o ambiente maior a população microbiana, aumentando os riscos para a saúde.

Com o aumento na densidade de estocagem dos sistemas de cultivo, os peixes também ficaram mais propensos a infecções em consequência da alta densidade populacional, baixos níveis de oxigênio dissolvido e elevada taxa de matéria orgânica (HIRSCH et al., 2006). Para prevenção e tratamento das doenças e também como promotores de crescimento se faz uso de agentes antimicrobianos, muitas vezes de forma indiscriminada (MARSHALL e LEVY, 2011), o que tem aumentado de forma global a resistência microbiana em ambientes aquáticos (HIRSCH et al., 2006).

Os agentes antimicrobianos podem matar os micro-organismos diretamente ou inibir seu crescimento (KUMMERER, 2009). São constantemente abordados na literatura por causar grande impacto ao meio ambiente e problemas de saúde pública.

Nos sistemas de produção animal a utilização dessas substâncias é uma prática comum para garantir a produção e a competitividade do setor (REGITANO & LEAL, 2010). Na aquicultura causam mais impactos por serem adicionados diretamente na água de cultivo ou adicionados na alimentação (FIGUEIREDO e LEAL, 2008), acumulando resíduos desses compostos na água e sedimentos.

Os resíduos são encontrados frequentemente em estações de tratamento de esgoto, águas superficiais, lodo, solo (GASTALHO, SILVA e RAMOS, 2014; ELER e MILLANI, 2007), em quantidades traço, podendo ser identificados e quantificados. Por isso há muito interesse em pesquisas sobre o monitoramento dos resíduos desses medicamentos no ambiente (BILLA E DEZOTTI, 2003).

Os antimicrobianos e seus resíduos são liberados no ambiente aquático por meio da excreção de animais e pela presença em excesso nos esgotos (CANAL, 2010). São dispersados por todo ambiente e acabam entrando na cadeia alimentar, parando na mão do consumidor (BORRELY et al., 2012).

A resistência microbiana pode ser intrínseca, devido à ausência de algum mecanismo celular necessário para a sensibilidade, ou adquirida (VAZ, 2009), por meio de mecanismos como mutação e recombinação gênica, em que materiais genéticos como plasmídeos e integrons e também bacteriófagos são passados de um micro-organismo para outro, mesmo pertencendo à espécies distintas (LIM et al., 2009).

# 1 OBJETIVOS

## 2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a diversidade bacteriana e analisar o perfil de resistência a antimicrobianos em pisciculturas com diferentes densidades.

## 2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Quantificar a população bacteriana, identificar a diversidade de espécies, analisar o perfil de resistência a antimicrobianos e avaliar a qualidade física e química da água em diferentes densidades de estocagem de pisciculturas.

## 2.3 JUSTIFICATIVA

A falta de legislação especialmente em países em desenvolvimento, para o uso dessas substâncias acaba sendo um dos principais motivos para que sejam utilizados de forma indiscriminada (CARNEIRO, 2007), podendo causar resistência e múltipla resistência. Dessa forma, milhares de novos medicamentos precisam ser produzidos para substituir os que não fazem mais efeito.

O pouco conhecimento que se tem da microbiota desses ambientes aquícolas, faz com que sejam necessárias mais pesquisas que busquem identificar possíveis reservatórios microbianos para conhecer a diversidade e o comportamento dos mesmos. Visto que, genes de resistência a antimicrobianos podem ser disseminados na água entre micro-organismos da mesma espécie ou não (CARNEIRO, 2007) devido à pressão de seleção (MIRANDA e ZEMELMAN, 2002).

Desta forma, conhecer os impactos ambientais, sociais e econômicos causados nesses ambientes é necessário para buscar alternativas e outras ações que possam estabelecer o equilíbrio ambiental e a sustentabilidade, além de contribuir para novas diretrizes na formulação de legislações que estabeleçam o uso de antimicrobianos na piscicultura.

### **3 REFERENCIAL TEÓRICO**

#### **3.1 AQUICULTURA**

A aquicultura é uma atividade que tem como finalidade a produção de organismos aquáticos ou semi-aquáticos para consumo humano (SOUZA, 2007), praticada pelo homem há milhares de anos (LOPES, 2012).

Esta atividade agroindustrial vem expressando um rápido e forte crescimento (PARK et al., 2012; AKINBOWALE, PENG e BARTON, 2006), apontando a produção em água doce predominando a produção total da aquicultura (ALY e ALBUTTI, 2014). Seus produtos apresentam, em várias regiões do mundo, uma importante fonte de alimento (HEUER et al., 2009) com alto valor protéico. Praticada tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (PARK et al., 2012) e é de importância econômica e social, propiciando novas fontes econômicas e de trabalho (ELER E MILLANI, 2007).

Quando se trata da questão ambiental, a aquicultura traz alguns desafios em relação ao seu desenvolvimento, como a utilização dos recursos naturais, água e solo (ALY e ALBUTTI, 2014).

O Brasil apresenta condições veemente favoráveis para o desenvolvimento da aquicultura (AMÉRICO, 2013; MARENGONI, 2006), recursos hídricos ilimitados, extensa área territorial, sendo três quartos na zona tropical, energia solar abundante, grande variedade de espécies nativas para produção, possibilitando uma ótima lucratividade aos investimentos aplicados (OLIVEIRA et al., 2007).

Mesmo com todos os aspectos positivos, há um grande desafio para desenvolver a atividade com sucesso, principalmente de forma sustentável.

Um grande obstáculo que a piscicultura moderna precisa enfrentar é a disponibilidade de água, que é um problema mundial. Contudo, se observa os cuidados adequados que muitos estão tomando para que os mananciais sejam recuperados e conservados (CREPALDI et al., 2007).

O lançamento de efluentes gerados no cultivo de organismos aquáticos e a poluição por resíduos químicos utilizados nas diferentes fases do cultivo (OSTRENSKY e BOEGER, 2008) são considerados como um problema ambiental

por causar poluição nas águas naturais (AMÉRICO, 2013) podendo acarretar eutrofização da mesma (ELER E MILLANI, 2007).

Segundo Macedo e Tavares (2010), a eutrofização antrópica pode apresentar diferentes origens, como efluentes domésticos, industriais e atividades agrícolas, além dos efluentes gerados pelo cultivo de organismos aquáticos. Esses efluentes podem algumas vezes apresentar concentrações de algumas variáveis limnológicas fora da estabelecida pela legislação, embora normalmente não seja tão comum se comparado com efluentes industriais e municipais (BOYD e SCHIMITTOU, 1999).

As doenças bacterianas são um dos fatores que mais causam impacto negativo sobre o crescimento da aquicultura (ALY e ALBUTTI, 2014), havendo perdas significativas na produção aquícola, afetando o desenvolvimento econômico do setor em vários países (PEIXOTO et al., 2012).

Para Aly e Albutti (2014) a aquicultura tem mudado de direção, estando muito mais voltada para a questão da qualidade do que para produção. Pois a aquicultura sustentável que leva como base as questões ambientais, sociais e econômicas são de fato as que vão conseguir se estabelecer por longo tempo.

### 3.2 PISCICULTURA NO BRASIL

A Piscicultura é caracterizada como uma variante da aquicultura (LOPES, 2012) que consiste no cultivo de várias espécies de peixes. A atividade é de natureza econômica, podendo apresentar um ótimo investimento agropecuário e alto lucro para o país, principalmente pela exportação. Tem em vista o suprimento de alimento à grande parte da população, geração de novos empregos e melhoria de renda (CREPALDI et al., 2007).

A produção de peixes pode proporcionar um rápido retorno para o produtor rural, por isso vem crescendo cada vez mais no país, tanto que seu desenvolvimento tem sido maior do que outras atividades rurais tradicionais, como a pecuária e a agricultura (OSTRENSKY e BOEGER, 1998)

Em 2013, a produção total da piscicultura brasileira foi de 392,5 mil toneladas, sendo a tilápia como a espécie mais criada, correspondendo a 43,1% da produção nacional de peixes (IBGE, 2014).

Assim como a aquicultura, a piscicultura vem ganhando mais atenção por ser apontada como uma atividade de alto potencial poluidor (NEU et al., 2014) em virtude das quantidades consideráveis de matéria orgânica e nutrientes despejadas nos sistemas aquáticos (OLIVEIRA et al., 2007). Quando outras atividades são realizadas nas redondezas, acabam influenciando e até mesmo limitando o desenvolvimento da atividade (ELER E MILLANI, 2007). Porém, Neu e colaboradores (2014) afirmam que o manejo e o monitoramento quando adequados e de forma contínua, pode reduzir o impacto negativo, favorecendo a sustentabilidade.

A sustentabilidade deve ser a essência e o suporte para o desenvolvimento ordenado da aquicultura e todos seus setores, envolvendo não só a sustentabilidade dos recursos naturais, mas a relevância e as melhorias sociais e econômicas (HENRY-SILVA E CAMARGO, 2008).

### 3.3 SISTEMAS DE CULTIVO

Diversos sistemas de produção são desenvolvidos na indústria aquícola, desde o cultivo de peixes em pequenas lagoas, para consumo interno, até sistema de produção intensivo, com escala industrial (HEUER et al., 2009). Além disso, para cada espécie pode haver um tipo de sistema de cultivo específico (PARK et al., 2012).

Na literatura, os tipos de sistemas são definidos de acordo com as práticas de manejo, uso de insumos e intensidade de estocagem (SOUZA, 2007). Sendo divididos em sistema extensivo, semi-intensivo, intensivo e superintensivo. A classificação por produtividade é a mais adotada aqui no Brasil (CREPALDI et al., 2007).

#### 3.3.1 Extensivo

O sistema extensivo é realizado em lagos ou represas naturais onde os peixes permanecem até serem capturados, recebendo apenas alimentação advinda do próprio ambiente (LOPES, 2012). Porém geralmente são cultivados em viveiros

escavados (KUBITZA, 2011), apresentando em média uma densidade de estocagem de 1000 a 2000 peixes/hectare com ganho de 300 a 700 Kg/ha/colheita. Sendo de baixa densidade pode haver mais de uma espécie no mesmo viveiro e ainda a presença de machos e fêmeas. Devido às perdas de água por infiltração e evaporação é necessária a restituição de água, assim como para encher os mesmos. Nesse sistema a maior parte da produção é para consumo próprio da família produtora e a fração restante é comercializada (CREPALDI et al., 2007).

O mercado consumidor, a indústria e o emprego de novas tecnologias estão aumentando e com isso os sistemas extensivos tradicionais estão sendo substituídos pelos sistemas semi-intensivo e intensivo (CREPALDI et al., 2007). Os mesmos autores ainda afirmam que, a implantação dessas tecnologias que intensificam a produção podem ser feitas nos próprios viveiros, especialmente em países da América Central e do Sul como o Brasil, onde há maior abundância em fontes de terra e água (CREPALDI et al., 2007). Os aspectos positivos que o país oferece como condições climáticas e geográficas contribui para as mudanças (MIAN, 2006).

### 3.3.2 Semi-intensivo

Em sistema semi-intensivo, o cultivo da maioria dos peixes é realizado em viveiros escavados (Borghetti e Silva, 2008), porém, com a utilização de técnicas de manejo, como aeração artificial, alimentação controlada, controle de entrada e saída de água, remoção de dejetos e controle da qualidade da água, favorece o aumento da produção (CREPALDI et al., 2007). O sistema apresenta em média uma densidade de estocagem de 3 a 5 peixes/10 m<sup>2</sup> (LOPES, 2012).

### 3.3.3 Intensivo

O sistema intensivo tem o propósito de atingir alta produtividade por metro quadrado, sendo os viveiro implantados especificamente para a criação de peixes de uma espécie somente, apresentando em média uma densidade de estocagem de 1 a 3 peixes/m<sup>2</sup> (LOPES, 2012).

Nos sistemas intensivos com recirculação de água, ocorre a passagem da água por todos os tanques de cultivo, em seguida ela segue para tratamento com filtros mecânicos e biológicos e depois retorna ao sistema (CREPALDI et al., 2007). É considerada uma forma ecologicamente correta por utilizar pouca água, apenas a quantidade necessária para repor a água perdida no tratamento e evaporada, essa perda é em torno de 5% do volume total do sistema por dia. O uso de áreas pequenas é outro ponto positivo (CREPALDI et al., 2007).

O monitoramento da qualidade da água é essencial nos sistemas de cultivo intensivo, em se tratando de um sistema limnológico complexo, a ocorrência das variações advém do metabolismo dos peixes e de micro-organismos que habitam esses ambientes (CREPALDI et al., 2007). Logo, acompanhar constantemente todos os parâmetros é uma forma de melhorar o desempenho e a harmonia do sistema. (KUBITZA, 2000).

#### 3.3.4 Superintensivo

O sistema superintensivo é normalmente realizado em tanques-rede ou gaiolas e nos *raceways* apresentando fluxo de água contínuo, sendo cultivada uma espécie somente de peixe em alta densidade e estocagem. Em torno de 20 a 100 peixes/m<sup>2</sup> em cada metro cúbico de tanques pequenos ou gaiolas (LOPES, 2012).

Segundo Zimmermann e Fitzsimmons (2004), essa modalidade tem condições de ser desenvolvida em quase todo território brasileiro e tem como fator positivo a proximidade de lugares onde a oferta de peixes no mercado é baixa.

Porém, na fase de implantação apesar do custo ser baixo, os gastos com a produção acaba sendo alto, pela dependência total da utilização de ração, por exemplo (ZIMMERMANN E FITZSIMMONS, 2004). Além disso, o aumento da densidade de estocagem no sistema tende a reduzir o peso individual, visto que a intensificação promove o aumento da biomassa total (MARENGONI, 2006).

De acordo com Krummenauer e colaboradores (2011), a conseqüência da intensificação na produção, aliada à redução de renovação de água, gera grande acúmulo de resíduos, principalmente de compostos nitrogenados. Mas a questão

econômica acaba estimulando o emprego dos sistemas intensivos (PARK et al., 2012).

A produção em tanques-rede utiliza os recursos aquáticos assim como os demais sistemas de cultivo, acarretando sérios impactos ambientais, como a falta de controle sobre a poluição pelos tanques estarem alocados em águas públicas ou a água aproveitada por usuários, bem como a introdução de patógenos (CREPALDI et al., 2007).

A intensificação dos sistemas veio a propiciar o aumento de doenças em peixes (MIAN, 2006; HIRSCH et al., 2006). Mas, para Borghetti e Silva (2008) são os que apresentam maior crescimento econômico apesar de ainda não serem os mais expressivos.

Henry-Silva e Camargo (2008) afirmam que à medida que a produção de organismos aquáticos se intensifica, os impactos negativos sobre o ambiente aumentam.

Entretanto, é possível ter qualidade e sustentabilidade nesses sistemas de produção, tanto dentro e fora, como no ambiente que são envolvidos, quando o monitoramento da qualidade é contínuo (MARENGONI, 2006).

### 3.4 QUALIDADE DA ÁGUA

Pisciculturas apresentam ecossistemas dinâmicos por apresentarem baixa profundidade e fluxo contínuo de água nos viveiros, o que afeta de forma direta as variáveis limnológicas (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2010). Assim, o êxito da atividade está associado à qualidade física e química da água, sendo a temperatura, oxigênio dissolvido, transparência, pH, amônia, alcalinidade, entre outros, os principais parâmetros a ser controlados numa piscicultura (SOUZA, 2007). Com base na análise de parâmetros físicos, químicos e biológicos pode-se medir a qualidade da água, que por sua vez indica poluição quando estão acima dos valores estabelecidos para determinado uso (GRADVOHL et al., 2007)

De acordo com Oliveira e colaboradores (2007), uma água de boa qualidade reflete de modo positivo nos organismos existentes, assim como ao contrário, provoca prejuízo aos mesmos e ao meio ambiente. Os mesmos autores ainda

afirmam que, é importante não esquecer que a piscicultura é uma fonte de poluição, que lança quantidade relevante de matéria orgânica no meio aquático, quando em fluxo de água contínuos.

A qualidade da água sofre interferência da piscicultura principalmente pelo aumento de sólidos em suspensão e o excesso de nutrientes advindos da matéria orgânica presente no ambiente, pela excreção de animais, subprodutos metabólicos e ração não consumida pelos peixes (TOVAR et al., 2000; TACON e FORSTER, 2003; PILLAY, 2004).

Fatores como a densidade de estocagem, espécie de peixe cultivada e técnicas de manejo podem acarretar na degradação da qualidade da água, alterando a ecologia dos sistemas, influenciado acima de tudo, os nutrientes, oxigênio dissolvido, condutividade elétrica, matéria orgânica, pH, biomassa bentônica e planctônica (MINUCCI et al., 2005).

Por isso a monitorização da qualidade da água é de grande importância em todo o sistema, para eliminar riscos a saúde humana quando o uso dos recursos hídricos é intensivo (ABRAHAM, 2010).

Guo e Li (2003) colocam que a capacidade de suporte do sistema precisa ser respeitada em todos os sistemas de produção e para toda estratégia aplicada, a fim de que os impactos possam ser minimizados, possibilitando o desenvolvimento sustentável da atividade.

### 3.5 DIVERSIDADE MICROBIANA AQUÁTICA

Os micro-organismos são componentes importantes nos ambientes aquáticos, realizando uma importante função no processo de produção primária e decomposição (SILVA, 2014). São encontrados em todos os locais, solo, ar, água, além, dos mais adversos ambientes, fossas oceânicas, vulcões, ambientes salinos, entre outros. Um dos habitats principais das bactérias é a água, sendo um importante veículo para a sua disseminação (SARAPICOS, 2008).

De acordo com Sengelov e Sorensen (1998), micro-organismos de diferentes origens acabam se aproximando, devido às águas de ambientes próximos se unirem.

Entre as bactérias aquáticas, alguns grupos são considerados como patógenos ao ser humano e outros como oportunistas, como algumas espécies de *Vibrio* (HEUER et al., 2009). Segundo os mesmos autores, infecções causadas por estas bactérias podem ter sido disseminada do ambiente aquático.

Outras bactérias bem adaptadas a viver em solo e água, são do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas*. Porém, podem estar presentes na água doce outros grupos bacterianos, como membros da família Enterobacteriaceae, gêneros como *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Aeromonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e ainda bactérias anaeróbicas como *Clostridium* sp. (DAL PUPO, 2006).

A microbiota aquática está intimamente ligada aos aspectos físicos e químicos do ambiente. Esses micro-organismos fazem parte da microbiota associada ao peixe, que muitas vezes são oportunistas e quando há um desequilíbrio no sistema micro-organismo-hospedeiro-ambiente, ocorrem sérias epizootias (CONCEIÇÃO et al., 2012).

Os patógenos de ambientes aquáticos geralmente são diferentes dos patógenos de mamíferos, em relação às exigências nutricionais, temperatura e crescimento. As culturas de patógenos aquáticos são adaptadas a temperatura de 22, 28 e 35 °C, mais amenas do que as utilizadas para crescimento de patógenos de mamíferos (PARK et al., 2012).

No ambiente, as bactérias dos animais acabam resistindo por pouco tempo. Entretanto, as que são resistentes aos antimicrobianos podem transferir seus genes de resistência para bactérias do solo, por meio das excretas e compostos residuais oriundos da produção animais, e estes podem sobreviver por longo tempo no solo (GASTALHO, SILVA e RAMOS, 2014).

As pisciculturas proporcionam condições que podem alterar a microbiologia do sedimento e enriquecer agentes patogênicos humanos, como o efeito associado de altos níveis de nutrientes, redução de oxigênio e o uso de antimicrobianos (TAMMINEN et al., 2011).

Segundo Baquero, e colaboradores (2008), são importantes pesquisas que busquem conhecer mais o impacto causado no ambiente aquático pela ação

humana, por meio de estudos sobre a resistência aos antimicrobianos em organismos indígenas da água.

Os micro-organismos desempenham importantes funções nos ciclos biogeoquímicos e processos metabólicos, porém, causam grande impacto no ambiente aquático (HUANG, 2014), como presença de reservatórios de bactérias patogênicas e a produção de substâncias nocivas. Por isso, a diversidade de micro-organismos pode indicar se o ecossistema se encontra saudável ou com algum surto de doença (ZENG et al., 2010).

### 3.6 ANTIMICROBIANOS

Antimicrobianos são agentes quimioterápicos que tem a capacidade de matar ou inibir o crescimento de micro-organismos, tais como fungos, bactérias ou protozoários (KUMMERER, 2009) e são frequentemente discutidos na literatura por causar grande impacto ao meio ambiente e problemas na saúde pública.

Em torno de 100.000 toneladas de antimicrobianos são produzidos por ano no mundo todo (NIKAIDO, 2009) e muitas classes como os macrolídeos, tetraciclina, sulfonamidas, quinolonas e  $\beta$ -lactâmicos não são eliminados durante o processo de tratamento convencional de águas, permanecendo resíduos (GASTALHO, SILVA e RAMOS, 2014) capazes de serem identificados e quantificados.

Por isso há um crescente interesse pelo monitoramento dos resíduos desses medicamentos no meio ambiente, que são encontrados com frequência nas estações de tratamento de esgotos e rios, nas concentrações de micrograma por litro ( $\mu\text{g/L}$ ) e nanograma por litro ( $\text{ng/L}$ ) (BILLA e DEZOTTI, 2003).

Segundo Bound et al., 2006, estima-se que os agentes antimicrobianos estão entre os fármacos que mais causam impacto ao ambiente, com (76,6%), seguido pelo hormônios (73,6%) e em terceiro, os antidepressivos (69,4%). O primeiro em especial por ser responsável pelo desenvolvimento de bactérias resistentes (EICKHOFF, HEINECK e SEIXAS, 2009).

A maioria dos antimicrobianos de uso clínico é de origem natural e seus derivados

são semi-sintéticos. Podem ser classificados em  $\beta$ -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas, oxapeninas e monobactamas), tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, peptídicos cíclicos (glicopeptídeos, lipodepsipeptídeos), estreptograminas, entre outros (lincosamidas, cloranfenicol, rifamicinas, etc.) (GUIMARÃES, MOMESSO e PUPU, 2010). Os antimicrobianos de origem sintética são classificados em sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012).

Os agentes antimicrobianos apresentam diferentes espectros de atividade, alguns apresentam um espectro de ação restrito, afetando um pequeno grupo microbiano, outros apresentam um amplo espectro de ação, afetando bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012).

Aparentemente, quanto maior o espectro de ação, mais vantajoso o tratamento de uma doença, porém isso reflete no grau de toxicidade seletiva. Quanto maior o espectro de ação, maiores chances de grande parte da microbiota normal do hospedeiro ser destruída também (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012).

O espectro de atividade limitado de cada antimicrobiano é importante para compreender como funcionam os mecanismos de ação e a aplicação adequada de cada agente (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012). Pois cada classe de antimicrobianos tem um alvo específico na célula bacteriana (GOLL e FARIA, 2014). Os principais mecanismos de ação e os espectros de atividade dos antimicrobianos mais comuns estão resumidos na Tabela 1.

**Tabela 1** - Mecanismos de ação e espectros de atividade dos agentes antimicrobianos.

Antimicrobianos	Mecanismo de ação	Espectro de ação
Penicilinas naturais	Inibidores da síntese da parede celular	Gram-negativa
(Penicilina G)		Gram-positiva
(PenicilinaV)		
Penicilina semissintéticas		
(oxacilina)		Resistente a penicilinase
(ampicilina, amoxicilina, imepenem)		Amplo espectro
(aztreonam)		Gram-negativa
Cefalosporinas		
“...continua...”		

“Tabela 1, continua”

Antimicrobianos	Mecanismo de ação	Espectro de ação
(cefalotina)		Gram-positiva
(cefepima)		Amplu espetro
Antibiótico polipeptídico (bacitracina, vancomicina)		Gram-positiva
Antibióticos antimicobacterianos (isoniazida, etambutol)		<i>Mycobacterium</i> spp.
Cloranfenicol	Inibidores da síntese proteica	Amplu espetro
Aminoglicosídeos (estreptomina, neomicina, gentamicina)		Amplu espetro
Tetraciclina (tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina)		Amplu espetro
Macrolídeos (eritromicina)		Gram-negativa
(azitromicina, claritromicina)		Amplu espetro
(telitromicina)		Gram-negativa
Estreptograminas (quinupristina e dalfopristina)		Gram-positivas
Oxazolidinonas (linezolida)		Gram-positivas
Polimixina B	Dano à membrana plasmática	Gram-negativa
Rifamicinas	Inibidores da síntese de ácidos nucléicos	Micobactérias
Quinolonas e fluoroquinolonas (ácido nalidíxico, norfloxacin, ciprofloxacina)		Amplu espetro
(gatifloxacina)		Gram-positivas
Sulfonamidas (trimetoprim-sulfametoxazol)	Inibidores competitivos da síntese de metabólitos essenciais	Amplu espetro

(Adaptada de Tortora, Funke e Case, 2012).

A aquicultura apresenta grande diversidade no setor em relação a fisiologia das espécies, o ambiente de cultivo, por isso o uso dos agentes antimicrobianos não é o mesmo em todas as situações. Deve-se levar em conta as características dos antimicrobianos como, dosagem, farmacodinâmica e farmacocinética, uso adequado do medicamento e as espécies cultivadas (PEIXOTO, GODIANO e COSTA, 2012).

O pH e a temperatura também são dois fatores importante na seleção dos agentes antimicrobianos, porém são de difícil controle. Uma temperatura mais alta, por exemplo, está relacionada com uma melhor absorção, distribuição, metabolismo e excreção do medicamento (PARK et al., 2012).

Em geral, os países retratam uso de agentes antimicrobianos diferentes um do outro, porém os mais frequentemente utilizados na aquicultura mundial pertencem aos grupos das tetraciclina, das sulfonamidas, das quinolonas de primeira e segunda geração (GUARDABASSI et al., 2010) e o cloranfenicol (SARAPICOS, 2012; SMITH et al., 2008).

A Tabela 2 mostra os principais antimicrobianos utilizados na aquicultura mundial, sendo alguns considerados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), como criticamente importante na medicina humana (HEUER et al., 2009).

**Tabela 2** - Principais antimicrobianos utilizados na aquicultura mundial e a importância na medicina humana.

Agente antimicrobiano (classe de antimicrobianos)	Importância da classe em medicina humana
Amoxicilina (aminopenicilinas)	Criticamente importante
Ampicilina (aminopenicilinas)	Criticamente importante
Cloranfenicol (fenicol)	Importante
Florfenicol (fenicol)	Importante
Eritromicina (macrólidos)	Criticamente importante
Estreptomicina, neomicina (aminoglicosídeos)	Criticamente importante
Furazolidona (nitrofuranos)	Importante
Nitrofurantoína (nitrofuranos)	Importante
Ácido oxolínico (quinolonas)	Criticamente importante
Enrofloxacina (fluoroquinolonas)	Criticamente importante
Flumequina (fluoroquinolonas)	Criticamente importante
Oxitetraciclina, clortetraciclina, tetraciclina (tetraciclina)	Muito importante
Sulfonamidas	Importante

(Adaptada de HEUER et al., 2009).

Dentre os agentes antimicrobianos utilizados na aquicultura, alguns são liberados pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAPA), como o florfenicol, a oxitetraciclina e a neomicina (este último é destinado para peixes ornamentais). Os

demais são empregados demasiadamente e sem conhecimento do alto risco ambiental e para saúde humana e animal (PÁDUA et al., 2012).

Dessa forma, uma série de compostos ativos pode estar presente nas águas residuais, de superfície, lamas e solo devido ao uso e descarte inadequado dos antimicrobianos pela medicina humana e veterinária (GASTALHO, SILVA e RAMOS, 2014; ELER e MILLANI, 2007).

A água como um solvente universal consegue solubilizar os antimicrobianos presentes no ambiente, porém as partículas se unem ao solo e ao sedimento dificultando sua biodegradação, acumulando-se no ambiente (BAQUERO, MATINEZ e CANTÓN, 2008).

Estudos foram realizados em muitos países comprovando a existência de resíduos fármacos em pequenas quantidades. As concentrações variaram de ng/L a µg/L, em amostras ambientais (EICKHOFF, HEINECK E SEIXAS, 2009).

Trabalho realizado por Zuccato e colaboradores (2005), detectaram a presença de resíduos de vários antimicrobianos em nove estações de tratamento de esgoto na Itália: ofloxacino, furosemida, atenolol, hidroclorotiazida, carbamazepina, ibuprofeno, benzafibrato, eritromicina, lincomicina, e claritromicina. Também na Itália, Calamari e colaboradores (2003), observaram em oito estações de esgoto ao longo dos rios Po e Lombro a presença de 18 antimicrobianos.

Billa e Dezotti (2003) afirmam que os resíduos desses compostos podem causar prejuízos na saúde humana e de outros organismos aquáticos, como os peixes. Embora em quantidades baixas, são o suficiente para causar intoxicações (HERNANDO et al., 2005).

Segundo Borrely e colaboradores (2012), mesmo pela limitada compreensão que se tem da interação dos medicamentos com o ambiente, a baixa volatilização desses compostos mostram que eles são espalhados no ambiente aquático por transporte e acabam entrando na cadeia alimentar por dispersão.

### 3.7 USO DE ANTIMICROBIANOS NA PRODUÇÃO ANIMAL

Os antimicrobianos são utilizados em animais por diversos motivos, como tratamento, controle e prevenção de infecções causadas por agentes patogênicos e

promotores de crescimento, este último visto por muito tempo somente seu lado positivo e as consequências negativas negligenciadas (MARSHALL e LEVY, 2011).

A utilização desses medicamentos é uma prática comum para garantir a produção e a competitividade do setor (REGITANO e LEAL, 2010). Mas o uso desses medicamentos como promotores de crescimento foi proibido nos últimos anos em alguns países, como União Européia, Suécia e Suíça (KUMMERER, 2009). O Brasil tem buscado se adaptar às exigências internacionais de exportação e atender às legislações vigentes (SANTANA et al., 2011).

Em 1998 foi proibido o uso da espiramicina, tilosina, virginiamicina e bacitracina, e a partir de 2008 proibiu-se o uso de todos os promotores de crescimento na UE. No Brasil, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) vetou a utilização de antimicrobianos como tetraciclinas, cloranfenicol, furazolidona, nitrofurazona, sulfanamidas e avoparcina e algumas empresas suspenderam voluntariamente o uso de bacitracina, tilosina, virginiamicina e espiramicina visando manter a exportação de frangos para a UE (BRUMANO; GATTÁS, 2009) (ARIAS e CARRILHO, 2012).

Uma importante via de disseminação dessas substâncias no ambiente é a aplicação de excretos animais para adubação do solo (BAQUERO, MATINEZ e CANTÓN, 2008) fazendo com que os resíduos de antimicrobianos se acumulem no solo ou sejam lixiviados para os sistemas hídricos (DÍAZ-CRUZ et al., 2003).

No entanto, a produção de organismos aquáticos é um dos sistemas de produção animal, dentre os quais fazem uso dos agentes antimicrobianos, que mais merecem atenção por causar impacto diretamente sobre o meio aquático (GORDON et al., 2006).

Na piscicultura, os antimicrobianos são aplicados diretamente na água de cultivo durante a fase de crescimento e terminação (FIGUEIREDO e LEAL, 2008), fazendo com que a água e os sedimentos tenham elevada concentração desses compostos (RUSU, HANCU e UIVAROS, 2014). Muitos são adicionados na alimentação, porém há um acúmulo no meio devido o excesso de alimento ou pela excreção dos animais (SARAPICOS, 2008), sendo eliminados de forma inalterada ou como metabólitos (RUSU, HANCU e UIVAROS, 2014).

Porém, de acordo com Park e colaboradores (2012), em sistemas superintensivos, a alta troca de água, faz com que a aplicação dessa prática não seja eficaz por causa do grande volume de água utilizada, o que reduz a concentração final dos medicamentos.

Segundo Marshall e Levy (2011), a quantidade de antimicrobianos utilizados na aquicultura é considerada menor comparando com os empregados nos demais sistemas de produção, mas por outro lado, muitas classes de medicamentos usados na aquicultura são também utilizadas na medicina humana.

Outro sério problema que ressurgiu na aquicultura, reconhecido como uma preocupação global é o uso de antimicrobianos em animais que são designados à alimentação (PARK et al., 2012). Os resíduos encontrados nas carcaças são grandes problemas para a exportação (FIGUEIREDO e LEAL, 2008).

São vários os problemas que o mau emprego dos antimicrobianos trás ao ambiente e a saúde pública, como o desenvolvimento de micro-organismos resistentes, a disseminação dos mesmos por todo o ambiente e a possível presença de resíduos de medicamentos nos produtos da aquicultura (OIE, 2006).

O aumento e a disseminação da resistência microbiana a medicamentos limitam severamente as opções terapêuticas em infecções humanas, por esse motivo o uso dos antimicrobianos em animais precisam ser controlados ou até mesmo contidos (HEUER et al., 2009).

Pesquisadores observaram que em pisciculturas que usavam antimicrobianos para promover o crescimento dos animais, tiveram o número de bactérias resistentes na flora intestinal dos trabalhadores e dos animais cultivados bem maiores do que as que não utilizavam (MARSHALL e LEVY, 2011).

A economia de vários países em desenvolvimento é a base da criação de animais e para garantir a produtividade do sistema, usam-se muitas vezes os antimicrobianos em excesso. A consequência disso é a crescente seleção de bactérias resistentes a antimicrobianos presentes nos animais, no solo e na água (BONELLI, MOREIRA e PICAIO, 2011).

No Brasil e vários outros países ainda não há legislação que estabeleça o uso desses medicamentos, especialmente na aquicultura. Isso faz com que eles sejam

utilizados sem maiores preocupações principalmente em sistemas de produção intensiva (JÚNIOR et al, 2006).

Várias instituições, como a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), OMS, Organização Mundial de saúde Animal (OIE) e Comissão Européia, na tentativa de reduzir os impactos negativos ocasionado pelo uso incorreto dos antimicrobianos, tem dado um olhar mais cuidadoso no uso dos antimicrobianos em animais, tanto pra proteger a eficácia dos medicamentos, como para conter o desenvolvimento e a disseminação de novos genes de resistência nos patógenos animais e a transmissão entre humanos e animais (GASTALHO, SILVA e RAMOS, 2014).

### 3.8 RESISTÊNCIA MICROBIANA A ANTIMICROBIANOS

Há anos que a questão da resistência microbiana a antimicrobianos tem sido encarada como um grande problema de saúde publica (MARSHALL e LEVY, 2011) em razão do aumento no uso de agentes antimicrobianos na medicina humana, animal e na agricultura (DAL PUPO, 2006).

Conhecer como funcionam os mecanismos de resistência bacteriana é fundamental para compreender como bactérias adquirem a resistência aos agentes (GUIMARÃES, MOMESSO e PUPU, 2010).

Normalmente os alvos que os antimicrobianos atingem são as enzimas, importantes para o metabolismo da célula bacteriana, dessa forma quanto mais essencial for o alvo para a célula, mais efetivo será o agente (MOTA et al., 2005). Caso a bactéria não seja afetada, mostra que ela possui alguma característica genética responsável pela sua sobrevivência (TORTOA, FUNKE e CASE, 2012).

A resistência a antimicrobianos acontece quando a bactéria adquire genes que impedem o mecanismo de ação do antibiótico (SILVA et al., 2009), podendo ser de forma intrínseca, devido à ausência de algum mecanismo celular necessário para a sensibilidade ou adquirida (VAZ, 2009), causada por mutação espontânea ou por recombinação gênica (MARTINEZ, 2009) originando variabilidade genética sobre a qual exerce seleção natural, atribuindo vantagens as mais aptas (MOTA et al., 2005).

Os genes de resistência são carregados por elementos genéticos móveis e fragmentos de DNA livres no ambiente, como plasmídeos, transposons ou bacteriófagos, podendo ser transferidos em bactérias de diferentes grupos taxonômicos (LIM et al., 2009).

Uma vez adquirida a resistência, podem ser transferidas por mecanismos normais de reprodução bacteriana e conseguinte, a progênie passar a portar a característica genética das bactérias parentais. Em virtude da elevada taxa de multiplicação bacteriana, em um curto período de tempos praticamente toda a população estará resistente a um novo antibiótico (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012).

Para escapar da ação dos antimicrobianos as bactérias possuem alguns mecanismos de resistência (PIDDOCK, 2006) como a destruição ou inativação enzimática do agente, prevenção de entrada no sítio-alvo da célula, alteração no sítio alvo do agente e bomba de efluxo (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012).

A destruição ou inativação do agente antimicrobiano acontece por enzimas presentes na bactéria, é mais efetiva contra antimicrobianos que são produtos naturais, como cefalosporinas e penicilinas (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012).

O bloqueio da entrada do agente antimicrobiano ocorre mais em Gram-negativas por serem naturalmente mais resistentes, devido à natureza da parede celular inibindo a absorção dos compostos e seu movimento pelas porinas (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012).

A Alteração no sítio-alvo do agente acontece por pequenas modificações na célula, podendo neutralizar os efeitos dos antimicrobianos sem que a ela seja prejudicada (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012).

Por último a bomba de efluxo que é um sistema onde proteínas conseguem bombear o medicamento do seu interior para fora antes que ocorra sua ação (PIDDOCK, 2006).

O uso inadequado desses medicamentos veio desenvolver e disseminar genes de resistência (HEUER et al., 2009) entre vários grupos de micro-organismos. Tornando muitas bactérias multiresistentes além de resistentes (NIKAIDO, 2009).

Em torno de 80% dos antimicrobianos que são utilizados na aquicultura, quando entram no ambiente são capazes de selecionar bactérias, essa seleção

modifica a biodiversidade tanto nos ambientes como na flora dos animais aquáticos (ALY e ALBUTTI, 2014).

Outros fatores que propiciam a disseminação de bactérias resistentes aos agentes antimicrobianos além da contaminação do ambiente é a falta de saneamento básico, falta de abastecimento de água potável, regiões superlotadas (BONELLI, MOREIRA e PICÃO 2014).

Segundo Bonelli, Moreira e Picão (2014), em países da América do Sul, muitos estudos não foram divulgados ainda sobre a consequência, para saúde humana, da contaminação ambiental por bactérias resistentes aos agentes antimicrobianos. Essa carência de dados, a falta de informações sobre o uso de antimicrobianos, o reuso de águas residuárias contaminadas e saneamento precário mostra um cenário preocupante para a saúde pública.

### 3.9 RESISTÊNCIA MICROBIANA A ANTIMICROBIANOS NO MEIO AQUÁTICO

A água é uma via de carreamento de genes de resistência para sistemas naturais, além de ser um meio frequente de disseminação de patógenos resistentes para humanos e animais (BAQUERO, MATINEZ e CANTÓN, 2008).

Frequentemente em diversos ambientes aquáticos têm sido reportado a presença bactérias patogênicas (GASTALHO, SILVA e RAMOS, 2014) resistentes aos antimicrobianos, entre eles, os esgotos hospitalares (PRADO et al., 2008), domésticos (HEUER et al., 2002), águas subterrâneas (GALLERT, FUND, WINTER, 2005) e rios (LIMA-BITTENCOURT et al., 2007).

Porém, nesses sistemas também são encontradas uma diversidade de bactérias comensais que podem atuar como reservatórios de genes de resistência (BAQUERO, MATINEZ e CANTÓN, 2008) e em consequência, transferirem esses genes para bactérias patogênicas.

Por longo tempo, um pequeno grupo de bactérias responsáveis por causar infecções foi tratado com mais cautela. Contudo uma grande diversidade de bactérias comensais supostamente inofensivas promovia continuamente troca de genes totalmente despercebido (AUBRY-DAMON, 2004).

Hoje sabe-se que essas bactérias com grande capacidade de transportar e mobilizar genes integram um grande reservatório de genes de resistência e que podem ser disseminados de várias formas e entre várias espécies, habitando em todo ambiente e nos animais até que ao longo do tempo de forma direta ou indireta alcance o homem (MARSHALL e LEVY, 2011).

Baquero e colaboradores (2008), afirmam que, se os seres humanos conseguirem controlar o uso em excesso dos antimicrobianos e a disseminação de bactérias, será uma maneira de reduzir o avanço da resistência microbiana aos mesmos.

Os antimicrobianos agem exercendo uma pressão seletiva de acordo com sua concentração, colaborando assim para o desenvolvimento e disseminação de resistência entre bactérias aquáticas (GORDON et al., 2006).

Entre os fatores que definem a quantidade de antimicrobianos excretado no meio aquático estão o tipo e a dosagem dos compostos, a espécie e idade dos animais (GASTALHO, SILVA e RAMOS, 2014).

As infecções bacterianas podem aumentar com a falta de qualidade da água e densidade populacional alta, essa situação colabora para o acréscimo na utilização dos agentes microbianos, contribuindo para o aumento da pressão seletiva sobre a microbiota aquática (HEUER, et al., 2009).

Se o tratamento for realizado de forma adequada em cada animal, a tendência será o controle do surgimento e disseminação de bactérias resistentes aos antimicrobianos, pois serão tratados somente alguns indivíduos e será aplicado a dosagem necessária dos medicamentos (MARSHALL e LEVY, 2011).

É importante evidenciar que nos corpos hídricos a fácil movimentação dos micro-organismos e elementos genéticos móveis como o plasmídeo, favorece a troca de genes de resistência (SMITH ET AL., 2008).

No ambiente aquático pode haver uma grande quantidade de bactérias resistentes que podem transmitir infecções ao homem que devido à resistência traço resulta em falhas no tratamento. Os patógenos humanos que podem estar envolvidos nessa propagação direta é o *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Shigella* spp. e *Salmonella* spp. ou patógenos oportunista, como

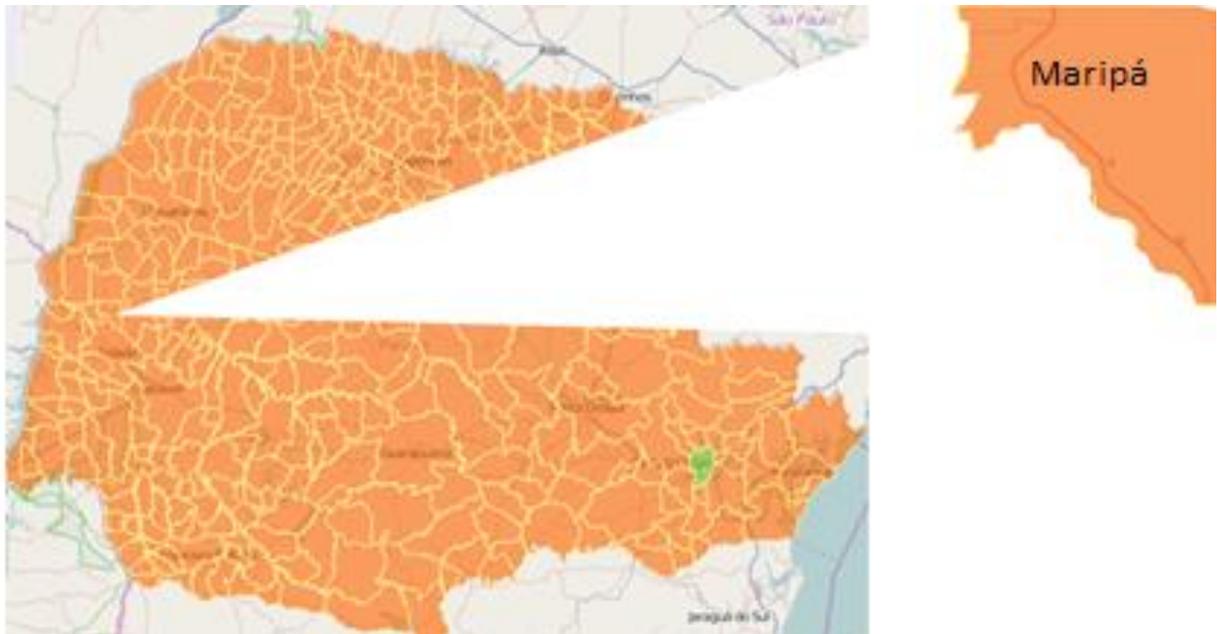
*Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*, *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus iniae* e *Escherichia coli* (ALY e ALBUTTI, 2014).

As águas de recreação e areias marinhas que recebem esgotos da cidade são fontes potenciais de bactérias resistentes, esses lugares contribuem para estabelecimento de rotas de propagação de micro-organismos que carregam genes e resistência a antimicrobianos (ANDRADE et al., 2015).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 ÁREA DO ESTUDO

O município de Maripá está localizado em uma latitude de 24° 25' 06" S, longitude de 53° 49' 48" W e altitude de 402m. Encontra-se na região oeste do estado do paraná, pertence ao 3° planalto de guarapuava, a uma distância de 95 km da cidade de cascavel e a 585 km da capital Curitiba (Figura 1).



**Figura 1** - Mapa do Estado do Paraná com destaque no município de Maripá.

Fonte: Adaptado do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

As principais atividades econômicas da atualidade no município estão voltadas para agricultura, produ o de orquídeas, e principalmente a aqüicultura.

Desenvolvem-se ainda as atividades no setor industrial, comercial e de prestação de serviços (MARIPÁ, 2013).

A aquicultura no município teve início em 1993, sendo destaque na região Oeste do Paraná pela produção de peixe, nesse período foram realizada também as primeiras construções de viveiros corretos para engorda de tilápia, o que veio a melhorar a produção (MARIPÁ, 2014).

#### 4.2 SELEÇÃO DAS PROPRIEDADES

Foram selecionadas três pisciculturas com produção de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), localizadas na área rural do Município de Maripá – Paraná. Cada propriedade contemplava uma densidade de estocagem diferente e a água de abastecimento foi proveniente de rio, sendo: Propriedade 1 (densidade de estocagem com 4 peixes por  $m^2$ ), rio 18 de Abril; propriedade 2 (densidade de estocagem com 8 peixes por  $m^2$ ), rio Azul; e propriedade 3 (densidade de estocagem com 10 peixes por  $m^2$ ), rio Lajeado Bem-Te-Vi (figura 2), em viveiros com área total variando de 2000 a 3000  $m^2$ , e um volume total em torno de 4200  $m^3$  e com renovação de 10% ao dia em todos os viveiros. Foram selecionados três viveiros de cada propriedade, do tipo escavado, com entrada de água individual, os peixes estavam em fase de crescimento e terminação, com peso médio de 400 g cada, alimentados três vezes ao dia (4 peixes/ $m^2$  - 53,76 Kg; 8 peixes/ $m^2$  - 107,52 Kg e 10 peixes/ $m^2$  - 134,4 Kg) com ração comercial, todas contendo fósforo (0,5% para 4 peixes/ $m^2$  e 8 peixes/ $m^2$  e 0,2% para 10 peixes/ $m^2$ ).



**Figura 2** - Pisciculturas localizadas na área rural do município de Maripá – PR, destacando os viveiros selecionados. 1: densidade de estocagem de 4 peixes por metro<sup>2</sup>, 2: densidade de estocagem de 8 peixes por metro<sup>2</sup> e 3: densidade de estocagem de 10 peixes por metro<sup>2</sup>.

Fonte: Prefeitura do município de Maripá/PR.

#### 4.3 COLETA E TRANSPORTE DAS AMOSTRAS

As coletas foram realizadas no mês de setembro de 2014, durante três semanas. Foram coletadas amostras de água de um viveiro por dia, sendo cada viveiro com uma densidade de estocagem diferente, durante três dias consecutivos, a cada semana, totalizando nove dias de coletas. Foram coletadas amostras de água de dois pontos de cada viveiro, na entrada (canaleta de abastecimento) e na saída (monge) e dois pontos do rio que às abasteciam (montante e jusante). Todas as coletas realizadas no início da manhã. Foram coletados dois litros de água de cada ponto para análises físicas e químicas e mais 100 ml em frascos esterilizados para análises microbiológicas. No momento das coletas foram obtidos os valores de temperatura (temp), potencial hidrogeniônico (pH), condutividade elétrica (Cond) e oxigênio dissolvido (OD) com aparelho portátil multiparâmetro da Professional Series YSI. Em seguida, as amostras foram transportadas em caixa térmica com gelo para o laboratório de microbiologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – *Campus* – Toledo, Unioeste, onde foi conduzido parte do experimento.

Todas as coletas foram realizadas em condições climáticas semelhantes, para tentar evitar interferências, em caso de precipitações nos dias das coletas ou no dia anterior as amostras não seriam realizadas.

#### 4.4 QUALIDADE FÍSICA E QUÍMICA DA ÁGUA

Imediatamente após a chegada, os dois litros de cada amostra foram encaminhados para o laboratório de Limnologia do Grupo de Pesquisa em Recursos Pesqueiros e Limnologia (GERPEL) da Unioeste, *campus* - Toledo, para realização das análises físicas e químicas da qualidade da água. Em cada amostra foram analisados os seguintes parâmetros: nitrogênio amoniacal ( $\text{NH}_4$ ) e fósforo total, segundo metodologia proposta por Mackreth e colaboradores (1978); nitrito ( $\text{NO}_2$ ), segundo metodologia proposta por Strickland e Parson (1972) e Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Matéria Orgânica (MO), segundo metodologia proposta pela Associação Americana de Saúde Pública (APHA), (2005).

#### 4.5 ISOLAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DAS POPULAÇÕES BACTERIANAS

As amostras coletadas foram submetidas a diluições seriadas para a quantificação das populações bacterianas. Alíquotas de 0,1 mL das diluições adequadas foram semeadas em duplicata em placas de Petri, pelo método de espalhamento em superfície, contendo Ágar Soja Trypticaseína (TSA) (Himedia) e Mac Conkey (MC) (Himedia), sendo o segundo meio para crescimento de bactérias patogênicas. Em seguida, as placas semeadas foram incubadas em estufa a 35° C por 24 horas. A leitura foi realizada por meio da contagem total das colônias e determinação das unidades formadoras de colônias por mililitro de amostra (UFC/mL) pela média das duplicatas.

Após a quantificação das populações bacterianas, foram selecionadas e repicadas em TSA três colônias de diferentes morfotipos de cada amostra. Os isolados foram armazenados em crio tubos contendo meio caldo infusão cérebro e coração (BHI) com glicerol para posterior identificação.

#### 4.6 IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS

Os isolados bacterianos foram acondicionados em caixa de isopor com gelo seco e enviado para o Laboratório Cedro em São Luís – Maranhão, para a identificação em gênero e espécie pela técnica de Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz - Tempo-de-Vôo/Espectrômetro de Massa (MALDI-TOF) biotyper-BRUKER/BD. O instrumento é projetado para identificação e caracterização automatizada de proteínas, detecção de biomarcador, controle de qualidade de oligonucleotídeos e genotipagem de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP). A amostra a ser analisada foi misturada com uma matriz e essa mistura foi aplicada a uma placa de metal e irradiada com laser. A leitura foi realizada em espectros (TANAKA et al., 1988). Os isolados bacterianos de teste foram ser de culturas puras com crescimento de 18 a 24 horas, obtidos em meios não seletivos, cultivados em placas com ágar sangue.

#### 4.7 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

Os 407 isolados bacterianos foram submetidos a determinação do perfil qualitativo de resistência a antimicrobianos, por meio do método de difusão de disco de antimicrobianos em ágar Mueller-Hinton (Difco, EUA) (CLSI, 2003). Foram selecionados 7 antimicrobianos para realização do teste de resistência, por serem alguns dos mais importantes na aquicultura: ampicilina (10 µg), sulfonamida (300µg), cloranfenicol (30 µg), nitrofurantoína (300µg), eritromicina (15 µg), tetraciclina (30 µg) e gentamicina (10 µg) (Laborclin, Brasil). Como controle de qualidade do teste, foram utilizadas as amostras de referência *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853).

Cada isolado foi repicado em meio TSA, após 24 horas uma porção da massa bacteriana foi resuspendida em tubo contendo solução salina estéril 0,85% e homogeneizada, sendo a turbidez da suspensão bacteriana comparada à do padrão 0,5 da escala Mc Farland. Em seguida, placas de Petri contendo Ágar MH foram estriadas com *swabs* estéreis embebidos na suspensão bacteriana, sendo o excesso retirado nas paredes dos tubos. Os discos de antimicrobianos foram colocados de forma equidistante com auxílio de pinça previamente flambada dentro das placas, na superfície do Ágar. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica à 35 °C durante 18 – 24 horas. Após o período de incubação, os diâmetros do halo de inibição foram mensurados e comparados com a tabela de performance padrão para testes de susceptibilidade do Instituto de Padrões clínicos e laboratoriais (CLSI) (CLSI, 2012).

#### 4.8 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE MÚLTIPLA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

O índice de múltipla resistência (MAR) foi utilizado para determinar a múltipla resistência, a partir dos resultados do antibiograma. O índice foi calculado pelo número de antimicrobianos aos quais tal isolado foi resistente sobre número de antimicrobianos aos quais o isolado foi exposto. Índice acima de 0,2 caracterizou multirresistência (KRUMPERMAN, 1983).

## 4.9 ANÁLISE DOS DADOS

### 4.9.1 Qualidade da água

As variáveis físicas e químicas da água mensuradas nos quatro locais de cada piscicultura foram linearmente combinadas por meio da análise de componentes principais (ACP) a fim de reduzir a dimensionalidade dos dados para interpretação e evitar a avaliação de relações espúrias. A ACP foi aplicada sobre a matriz de correlações bivariadas, adotando-se o critério de Kaizer-Gutmann para retenção e interpretação de eixos (GOTELLI e LISON, 2011). Esses foram então submetidos à análise de variância bi-fatorial, computando a variabilidade temporal como um efeito principal (ANOVA-bifatorial em blocos), seguida do teste de Tukey para comparação de médias. Transformações nas variáveis originais não foram necessárias visto que as checagens de pressupostos indicaram distribuições aproximadamente normais pelo teste de Shapiro-Wilk e variâncias homogêneas pelo teste de Levene. A análise de componentes principais foi realizada no software Pc\_Ord 5.0 (MCCUNE e MEFFORD, 2006), enquanto as ANOVAs-bifatoriais em blocos foram conduzidas no software Statistica 7.1 (STAFSOFT, 2005).

### 4.9.2 Quantificação das populações bacterianas

As concentrações de bactérias (transformados em raiz quadrada para atingir pressupostos da análise) foram correlacionadas aos eixos retidos da ACP e também avaliadas frente aos locais, densidades e tempos com ANOVAs-Bifatoriais em blocos. O nível de significância adotado para cada análise individual foi de 5%.

### 4.9.3 Diversidade bacteriana

A fim de avaliar a similaridade ou dissimilaridade entre as famílias bacterianas nas diferentes densidades de estocagem e locais, os dados foram submetidos a uma análise de ordenação. Foi utilizado como método de ordenação o escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) (MCCUNE e GRACE 2002). A

análise foi realizada no software Pc Ord 5.0. Em seguida, foram testadas pelo procedimento de permutação com múltiplas respostas (MRPP) (MCCUNE e GRACE 2002).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 QUALIDADE DA ÁGUA

O conjunto de variáveis físicas e químicas da água foi sumarizado em três componentes principais que apresentaram 61,87% da variabilidade total. O primeiro componente (26,88% de variabilidade computada) foi associado positivamente com as concentrações de  $\text{NH}_4$ , PT, MO e temp da água (Grupo 1), enquanto que ao OD foi negativamente associado (Tabela 3). Este conjunto de variáveis foi diferenciado no interior dos viveiros em relação à montante e a jusante do mesmo (ANOVA-bifatorial em blocos, fator Local:  $F_{(3, 18)} = 8,05$ ,  $p = 0,001$ ). Identificou-se que o grupo 1 apresentou valores superiores dentro do viveiro (locais 2 e 3), ao passo que o OD foi superior fora deste (local 4; Figura 3a). Interação entre locais e densidade, bem como efeito principal da densidade não foram significativos.

O segundo componente principal (21,60% de variabilidade) apresentou unicamente associação positiva com a concentração de  $\text{NO}_2$  (Tabela 3) e também apresentou variabilidade unicamente influenciada pelo fator local (ANOVA-bifatorial em blocos, fator Local:  $F_{(3, 18)} = 6,63$ ,  $p = 0,003$ ). Essa característica química da água foi diferenciada principalmente em relação a posição no interior dos viveiros (locais 2 e 3), sendo superior na região mais próxima a saída (local 3; Figura 3b).

O terceiro componente explicou 13,40% de variabilidade e esteve unicamente associado de forma negativa com a Cond da água (Tabela 3). Esta, por sua vez, variou significativamente entre os locais e densidades de estocagem (ANOVA-bifatorial em blocos, fator Local:  $F_{(3, 18)} = 4,64$ ,  $p = 0,014$ ; fator Densidade:  $F_{(3, 18)} = 4,38$ ,  $p = 0,028$ ). Em relação aos locais, observou-se que a Cond foi inferior a montante dos viveiros (local 1), sofreu uma elevação significativa no interior destes (locais 2 e 3) e passou a um valor intermediário a jusante (local 4), possivelmente devido a um efeito diluidor (Figura 3c). Para as densidades, a Cond foi superior nos

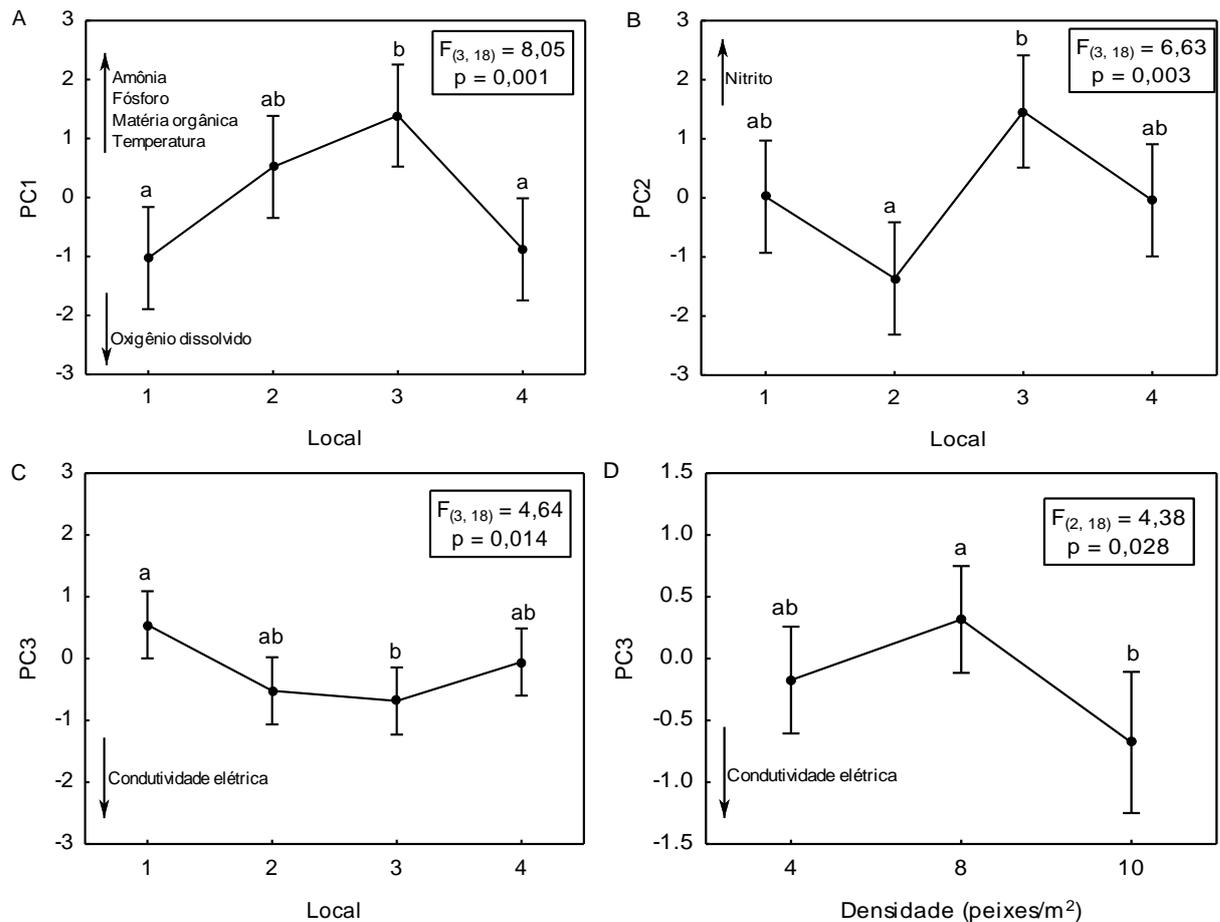
tanques que apresentaram maiores concentrações de peixes (Figura 3d). Esse parâmetro mede a quantidade de sais na água, quanto mais alto o valor mais sais solúveis presente no meio (RIBEIRO et al., 2005).

**Tabela 3** - Correlações entre as variáveis mensuradas nos quatro locais dos nove tanques com os componentes principais (CP) gerados a partir da análise de componentes principais. Características consideradas associadas aos CP são apresentadas em negrito.

Variáveis	CP1	CP2	CP3
Amônia	<b>0,7213</b>	0,5202	0,0711
Fósforo total	<b>0,6397</b>	0,4431	0,2024
Matéria orgânica	<b>0,6676</b>	0,2045	-0,2254
Temperatura da água	<b>0,6667</b>	-0,5507	0,0808
Oxigênio dissolvido	<b>-0,5838</b>	0,5741	0,1311
Nitrito	0,0734	<b>0,6257</b>	-0,4414
Condutividade elétrica	0,2748	-0,4513	<b>-0,6855</b>
DBO	0,0804	0,4581	-0,5554
DQO	0,4307	0,2954	0,4866
pH	-0,5045	0,3546	-0,0957
Autovalor	2,69	2,16	1,34
% de explicação	26,88	21,60	13,40

DBO: demanda bioquímica de oxigênio, BQO: demanda química de oxigênio

O aumento dessas variáveis no interior dos viveiros pode ser devido às sobras de ração, excesso de outros nutrientes e excreção de peixes. Souza (2007), afirma que há grande disponibilidade de nitrogênio e principalmente fósforo oriundos de ração não consumida por completo, na excreção animal, estimulando o aumento do fitoplâncton em consequência a queda das concentrações de OD.



**Figura 3** - Médias e intervalo de 95% de confiança para os componentes principais que sumarizaram as variáveis físicas e químicas da água. Variáveis associadas aos componentes são apresentadas próximas ao eixo. A) relação significativa entre o primeiro componente principal (CP1) e o fator local\*; B) relação significativa entre o segundo componente principal (CP2) e o fator local\*; C) relação significativa entre o terceiro componente principal (CP3) e o fator local\* e; D) relação significativa entre o terceiro componente principal (CP2) e o fator densidade. Letras minúsculas diferentes indicam médias distintas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

\*Local: pontos em que foram realizadas as coletas de água.

Trabalho realizado por Minucci e colaboradores (2005), avaliando as variáveis limnológicas na entrada, meio e saída de viveiros de pisciculturas com criação semi-intensiva, observou que as concentrações de fósforo e amônia apresentaram grandes flutuações e que na entrada dos viveiros houve uma média mais baixa dessas variáveis comparando com o meio e saída do mesmos. Resultados estes que corroboram com o presente estudo.

O mesmo autor afirma que essas variações pode ser devido ao aumento nos processos metabólicos das comunidades biológicas dos viveiros, com o acúmulo de matéria orgânica, porém, principalmente de aplicações de adubos.

Nas três pisciculturas avaliadas havia tanque de decantação, retendo quantidades excedentes de nutrientes e matéria orgânica, fazendo com que o efluente gerado chegasse ao rio com uma melhor qualidade, sugerindo a queda nos valores de cond,  $\text{NH}_4$ ,  $\text{NH}_2$ , FT e principalmente MO a jusante.

Segundo Kubitza (2007), o  $\text{NO}_2$  presente nos viveiros de cultivo que recebem baixa troca de água, excesso de alimentação ou fertilização, pode apresentar altas concentrações, sendo tóxico aos animais. O autor afirma ainda que valores acima de 0,3 mg/L são considerados prejudiciais ao desempenho dos peixes. Ostrensky e Boeger (1998) por sua vez, relatam que o  $\text{NO}_2$  passa a ser tóxico para os peixes em concentrações acima de 0,5 mg/L. Foi observado valores acima destes na saída das três densidade de estocagem (Tabela 4).

O Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) aprovou a resolução número 357, de 17 de março de 2005, definindo novos limites para parâmetros de qualidade de água na aquicultura (BRASIL, 2005). A resolução dispõe sobre a classificação dos corpos hídricos e estabelece condições para o lançamento de efluentes.

O valor de  $\text{NO}_2$  segundo padrões do CONAMA para água de Classe 2, destinada ao consumo humano e a criação de organismos aquáticos, é de até 1 mg/L (BRASIL, 2005). Os resultados deste estudo apresentaram-se dentro do limite recomendado, estando acima somente na saída das densidades de estocagem de 4 e 10 peixes/m<sup>2</sup>.

A concentração de OD não pode ser inferior a 5mg/L em qualquer amostra de água da classe 2, (BRASIL, 2005). No estudo, a concentração de OD apresentou-se fora do permitido, nas entradas dos viveiros das três densidades. Nos demais pontos, o OD apresentou valores dentro dos padrões da legislação (Tabela 4).

**Tabela 4** – Valores médios e erro padrão das variáveis físicas e químicas mensuradas em pisciculturas de diferentes densidades de estocagem.

Parâmetros	Densidade 4 peixes/m <sup>2</sup>			
	Montante	Entrada	Saída	Jusante
Temperatura (C°)	19,4 ± 0,49	20,6 ± 0,23	19,9 ± 0,82	19,4 ± 0,43
pH	7,3 ± 0,02	7,6 ± 1,36	7,5 ± 0,19	7,1 ± 0,10
OD (mg/L)	6,4 ± 0,35	4,4 ± 1,36	5,7 ± 1,88	6,6 ± 0,56
Cond (µS/cm)	55,7 ± 5,54	67,9 ± 10,94	60,2 ± 4,06	55,6 ± 5,44
Amônia (mg/L)	0,46 ± 0,05	0,48 ± 0,05	1,73 ± 0,14	0,55 ± 0,00
Fósforo (mg/L)	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,3 ± 0,12	0,03 ± 0,00
MO (mg/L)	197,2 ± 23,77	502,9 ± 191,65	856,1 ± 103,91	393,5 ± 195,28
Nitrito (mg/L)	0,17 ± 0,07	0,17 ± 0,07	2 ± 1,36	0,3 ± 0,18
DBO (mg/L)	13,3 ± 3,99	9,8 ± 3,01	14,8 ± 2,14	13,9 ± 5,65
DQO (mg/L)	14,5 ± 5,61	15,9 ± 4,32	23,2 ± 3,48	13,5 ± 3,76
Parâmetros	Densidade 8 peixes/m <sup>2</sup>			
	Montante	Entrada	Saída	Jusante
Temperatura (C°)	20,7 ± 0,60	22,6 ± 0,21	21,4 ± 0,48	20,8 ± 0,68
pH	7,2 ± 0,02	7 ± 0,19	7,1 ± 0,17	7,7 ± 0,32
OD (mg/L)	6,1 ± 0,15	4 ± 0,35	6 ± 0,51	6,2 ± 0,44
Cond (µS/cm)	49,6 ± 0,42	68,8 ± 3,28	59,4 ± 11,60	53,4 ± 2,17
Amônia (mg/L)	1 ± 0,09	0,9 ± 0,08	1,2 ± 0,02	0,9 ± 0,07
Fósforo (mg/L)	0,1 ± 0,03	0,1 ± 0,04	0,2 ± 0,10	0,1 ± 0,04
MO (mg/L)	207,8 ± 33,12	613,1 ± 183,05	807,9 ± 97,47	259,3 ± 67,12
Nitrito (mg/L)	0,4 ± 0,06	0,2 ± 0,08	0,8 ± 0,61	0,4 ± 0,10
DBO (mg/L)	9,7 ± 2,44	7,2 ± 4,44	18,1 ± 0,60	12 ± 1,31
DQO (mg/L)	13,9 ± 10,92	17,9 ± 5,95	24,9 ± 10,73	16,6 ± 8,0016
Parâmetros	Densidade 10 peixes/m <sup>2</sup>			
	Montante	Entrada	Saída	Jusante
Temperatura (C°)	20,7 ± 0,6	22,0 ± 0,75	20,2 ± 1,70	21,5 ± 0,00
pH	6,9 ± 0,095	7,3 ± 0,00	7,2 ± 0,08	7,3 ± 0,22
OD (mg/L)	5,5 ± 0,365	3,9 ± 0,23	5,9 ± 0,08	4,6 ± 1,31
Cond (µS/cm)	38,9 ± 0,5	83,9 ± 8,20	38,3 ± 23,05	60,5 ± 18,25
Amônia (mg/L)	1,0 ± 0,14	1 ± 0,05	1,2 ± 0,04	0,9 ± 0,07
Fósforo (mg/L)	0,1 ± 0,015	0,2 ± 0,06	0,1 ± 0,00	0,2 ± 0,02
MO (mg/L)	165,5 ± 32,19	330,6 ± 241,46	612,7 ± 66,27	164,1 ± 43,74
Nitrito (mg/L)	0,4 ± 0,005	0,5 ± 0,25	4,0 ± 3,92	0,4 ± 0,04
DBO (mg/L)	17,3 ± 1,255	14,9 ± 3,56	17,9 ± 5,15	20,0 ± 5,53
DQO (mg/L)	27,8 ± 12,54	20,2 ± 6,59	15,9 ± 8,29	26,4 ± 0,42

OD: oxigênio dissolvido, Cond: condutividade elétrica, MO: matéria orgânica, DBO: demanda bioquímica de oxigênio, BQO: demanda química de oxigênio.

Segundo Crepaldi e colaboradores (2007), altas concentrações de nitrogênio inorgânico é um sério problema para a qualidade da água em sistemas intensivos. Somando com aumento de amônia, pH e temperatura na água perante baixas concentrações de oxigênio dissolvido pode ocasionar a mortandade de peixes, acarretando em significativas perdas econômicas (ELER E MILLANI, 2007).

Os valores de amônia apresentaram-se superiores no interior dos viveiros, indicando uma alimentação rica em proteína que não foi totalmente assimilada e convertida pelo animal, sendo a amônia, principal forma de excreção de nitrogênio, eliminada pelas fezes (REBOLÇAS, 2010).

Apesar de ser volumoso, o efluente da aquicultura apresenta baixa quantidade de nutriente, mas o lançamento direto e contínuo pode acarretar na eutrofização desses ambientes aquáticos (KUBITZA, 1999) e conforme a intensificação aumenta, os impactos causados ao meio ambiente podem se tornar mais negativos (HENRY-SILVA E CAMARGO, 2008).

A água de abastecimento é utilizada para a manutenção dos níveis de água perdida por infiltração e evaporação dentro dos viveiros e especialmente em períodos de maiores precipitações também pode servir para descargas de efluentes (PAGGI, 2006).

Estudo feito em piscicultura semi-intensiva e intensiva na bacia hidrográfica do rio Ribeira de Iguape (SP), notou-se que essas são mais eutrofizadas, promovendo a alteração das características físicas e químicas dos ambientes lóticos em que seus efluentes são lançados (CASTELLANI e BARRELA, 2005).

A quantidade de sólidos suspensos, nutrientes dissolvidos e diminuição nas concentrações de oxigênio dissolvido estão principalmente relacionadas com a qualidade do efluente ao longo dos corpos hídricos (ELER e MILLANI, 2007).

Alguns nutrientes são bastante impactantes para o ambiente, como o nitrogênio e o fósforo que quando são eliminados de forma indiscriminada no meio aquático aumentam significativamente a produção primária de algas (CYRINO et al., 2010).

O estudo apresentou valores de PT que variaram de 0,03 a 1,2 mg/L. O CONAMA tras em sua resolução 357, limites para concentração de PT de até 0,03

mg/L. Apenas a montante e a entrada da menor densidade estava dentro do preconizado.

As temp da água variaram de 19,4 a 22,6 °C. Kubitza (1999) coloca que a faixa ideal para produção de espécies tropicais é em torno de de 28 a 32 °C. Essas temp mais amenas foi devido ao clima mais frio nos dias em que foram coletadas as amostras.

Lima e Garcia (2008) avaliando a qualidade de um açude em Ribeirópolis – Sergipe, verificaram que as concentrações de  $\text{NH}_2$  estavam bem acima das concentração de  $\text{NH}_4$ , sugerindo que a poluição seja antiga, isso acontece pelo fato do ambiente não conseguir se autodepurar. Esses resultados são diferentes do presente estudo que mostra valores de  $\text{NH}_4$  superiores ao de  $\text{NH}_2$ .

A autodepuração da água pode sofre vários efeitos devido as variações de temperatura, começando pelo aumento no metabolismos dos micro-organismos aquáticos e depois aumentando o consumo de oxigênio utilizado para respiração aeróbia (REBOLÇAS, 2010).

Segundo Phan-Van e colaboradores (2008), o OD está relacionado a temperatura da água. Ao passo que o OD aumenta a temperatura diminui, corroborando com o presente estudo que em temperatura mais elevadas, houve queda do OD.

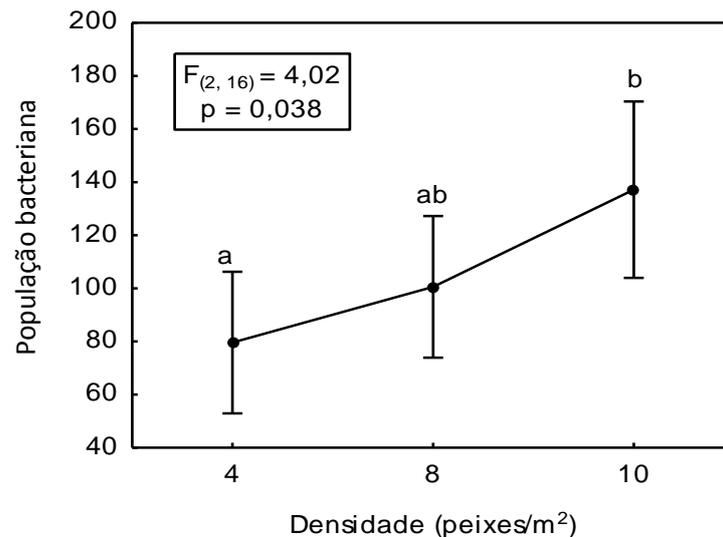
Todas as amostras apresentaram valores de pH adequado, de acordo com Kubitza (2008), que afirmam que, o pH para a produção de peixes deve ser mantido entre 6,0 e 8,5, a acidez ou alcalinidade elevada causa grande mortalidade.

Pelo fato das pisciculturas amostradas serem localizadas na região rural, áreas próximas ao desenvolvimento de atividades agrícolas, pecuárias e agroindustriais, acabam por vezes sofrendo com o excesso de contaminantes. Por sua vez, a piscicultura pode igualmente gerar efluentes que quando não tratados de forma adequada, desaguam nos corpos hídricos causando problemas ambientais.

## 5.2 CONTAGEM TOTAL DE MESÓFILOS HETEROTRÓFICOS

Os componentes principais que sumarizaram as características físicas e químicas não se apresentaram correlacionados com as concentrações de bactérias.

Porém, a população bacteriana aumentou com a elevação da densidade de peixes por  $m^2$  na água de cultivo (ANOVA-bifatorial em blocos, fator Densidade:  $F_{(3, 18)} = 4,02$ ,  $p = 0,038$ ; Figura 4).



**Figura 4** - Quantidade de bactérias observada nos tanques de cultivo com três diferentes densidades de estocagem de peixes. Médias  $\pm$  95% de intervalo de confiança das quantidades transformados em raiz quadrada. Letras distintas indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

De forma geral, foi encontrada grande quantidade de bactérias nas diferentes densidades de estocagem das pisciculturas, assim como nos diferentes locais, mostrando que o ambiente piscícola é propício para o desenvolvimento e disseminação dos micro-organismos, constituindo importantes reservatórios de patógenos de animais e humanos. Estes resultados mostram a importância do monitoramento da qualidade da água e do manejo adequado até o momento de abate dos peixes.

Conceição e colaboradores (2012) afirmam que maior incidência de chuva, por exemplo, pode alterar a carga microbiana, aumentando o número de UFC devido ao aumento de matéria orgânica em suspensão que serve de extrato para os micro-organismos.

Segundo Allen, Edberg e Reasoner (2004), bactérias heterotróficas são todas aquelas que exigem nutrientes orgânicos para seu crescimento, porém, qualquer que seja o método de contagem, somente uma pequena parcela de toda a diversidade existente é enumerada nos ambientes como água, solo e alimento.

Oliveira (2011) afirma que pelo fato das bactérias heterotróficas utilizarem a matéria orgânica como fonte de energia, são muito utilizadas como indicadoras da qualidade da água.

O aumento da população bacteriana na intensificação dos sistemas sugere que esses sejam ambientes mais propícios ao desenvolvimento de infecções, devido aos peixes estarem diante de fatores que desencadeiem mais facilmente o estresse, com isso há presença de grande quantidade de patógenos oportunista. Além disso, se não houver técnicas de manejo adequadas em cada sistema, a população bacteriana tende a aumentar.

Os resultados não apresentaram correlação entre os parâmetros físicos e químicos da água com a quantidade de bactérias como citado anteriormente, porém a qualidade da água está estritamente relacionada com a presença de micro-organismos. Meneghini (2013) enfatiza que as bactérias utilizam os nutrientes minerais, oriundo da matéria orgânica, havendo até mesmo uma disputa entre fitoplâncton e bactérias por estes nutrientes.

Segundo Silva (2010) mesmo em baixas concentrações, alguns micro-organismos patogênicos podem ser perigosos aos seres humanos e animais devido a contaminação cruzada.

### 5.3 DIVERSIDADE BACTERIANA NAS DIFERENTES DENSIDADES DE ESTOCAGEM

Dos 407 isolados bacterianos obtidos das amostras de água das diferentes densidades de estocagem de pisciculturas, foram identificadas 55 espécies de bactérias (Tabela 5) pertencentes a 11 famílias distintas, sendo oito dessas famílias Gram-negativa (Tabela 6). Corroborando com trabalhos como de Dal Pupo (2006) e Lima e colaboradores (2005) que estudando a diversidade bacteriana em

pisciculturas com produção de tilápia afirmam que em ambiente aquáticos a maioria das bactérias isoladas é de Gram-negativas.

Dentre as amostras bacterianas isoladas, 21 não foram possível ser identificadas pela metodologia aplicada. A espécie bacteriana *Serratia marcescens* foi a que obteve maior frequência de isolamento, seguida da espécie *Alcaligenes faecalis* e *Enterobacter asburiae*. A primeira e a terceira pertencentes à família Enterobacteriaceae, e a segunda à família Alcaligenaceae.

A bactéria da espécie *Serratia marcescens*, tem sido descrita como importante agente de infecção nosocomial, apresentando alta disseminação e alto nível de resistência intrínseca a vários antimicrobianos (CARVALHO et al., 2010).

A espécie *Alcaligenes faecalis* é saprófita, constituinte da microbiota fisiológica entérica de animais domésticos e humanos (KAHVECI et al., 2011).

Algumas espécies do gênero *Staphylococcus* são comumente encontradas em hospitais, não sendo indígenas do ambiente aquático, no entanto o presente trabalho identificou três espécies do gênero *Staphylococcus*. Carneiro e colaboradores (2007) realizaram pesquisa em diferentes sistemas de cultivo e encontraram várias espécies desse gênero. Lima e colaboradores (2005), trabalhando com a diversidade da microbiota aquática em ambiente de criação de tilápia, identificaram que 50% das bactérias da família Micrococcaceae eram pertencentes ao gênero *Staphylococcus*.

Foram identificadas somente dois isolados de espécies diferentes do gênero *Aeromonas* (*Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas veronii*). Porém é grupo que merece atenção por causar septicemias em peixes, sendo comuns nos sistemas de produção. Por ser oportunistas, geralmente acometem os peixes quando estão com sua imunidade comprometida (KUBITZA, 2008).

Esses dados diferem de trabalhos realizados por Silva (2010); HIRSCH et al., 2006) e (AKINBOWALE, et al., 2007) que encontraram grande ocorrência desse agente bacteriano, principalmente em água.

**Tabela 5** - Diversidade e frequência de espécies bacterianas obtidas de diferentes densidades de estocagem de piscicultura.

N°	Espécies	Família	Densidade de estocagem						
			4 px/m <sup>2*</sup>		8 px/m <sup>2**</sup>		10 px/m <sup>2***</sup>		Total
1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Aeromonadaceae	0	0%	1	1%	0	0%	
2	<i>Aeromonas veronii</i>	Aeromonadaceae	0	0%	0	0%	1	1%	1
3	<i>Achromobacter spanius</i>	Alcaligenaceae	1	1%	1	1%	0	0%	2
4	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Alcaligenaceae	17	21%	46	26%	0	0%	63
5	<i>Bacillus pumilus</i>	Bacillaceae	0	0%	2	1%	13	9%	15
6	<i>Bacillus subtilis</i>	Bacillaceae	1	1%	0	0%	0	0%	1
7	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	Bacillaceae	0	0%	0	0%	4	3%	4
8	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	Bacillaceae	0	0%	0	0%	1	1%	1
9	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	Bacillaceae	1	1%	0	0%	0	0%	1
10	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	Bacillaceae	0	0%	0	0%	1	1%	1
11	<i>Solibacillus silvestris</i>	Bacillaceae	0	0%	2	1%	0	0%	2
12	<i>Bacillus altitudinis</i>	Bacillaceae	1	1%	0	0%	1	1%	2
13	<i>Bacillus cereus</i>	Bacillaceae	0	0%	2	1%	2	1%	4
14	<i>Bacillus megaterium</i>	Bacillaceae	1	1%	2	1%	0	0%	3
15	<i>Ochrobactrum grignonense</i>	Brucellaceae	0	0%	1	1%	0	0%	1
16	<i>Comamonas testosteroni</i>	Comamonadaceae	1	1%	0	0%	0	0%	1
17	<i>Citrobacter freundii</i>	Enterobacteriaceae	2	3%	10	6%	15	10%	27
18	<i>Citrobacter koseri</i>	Enterobacteriaceae	1	1%	0	0%	0	0%	1
19	<i>Citrobacter youngae</i>	Enterobacteriaceae	0	0%	0	0%	1	1%	1
20	<i>Cronobacter sakazakii</i>	Enterobacteriaceae	0	0%	1	1%	0	0%	1
21	<i>Enterobacter amnigenus</i>	Enterobacteriaceae	0	0%	3	2%	0	0%	3
22	<i>Enterobacter asburiae</i>	Enterobacteriaceae	11	14%	11	6%	21	14%	43

“...continua...”

"Tabela 5, continua"

N°	Espécies	Família	Densidade de estocagem						
			4 px/m <sup>2*</sup>		8 px/m <sup>2**</sup>		10 px/m <sup>2***</sup>		Total
23	<i>Enterobacter cloacae</i>	Enterobacteriaceae	4	5%	4	2%	2	1%	
24	<i>Enterobacter kobei</i>	Enterobacteriaceae	0	0%	17	10%	1	1%	18
25	<i>Enterobacter ludwigii</i>	Enterobacteriaceae	1	1%	0	0%	1	1%	2
26	<i>Enterobacter radicincitans</i>	Enterobacteriaceae	0	0%	2	1%	0	0%	2
27	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae	2	3%	1	1%	0	0%	3
28	<i>Hafnia alvei</i>	Enterobacteriaceae	0	0%	1	1%	0	0%	1
29	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Enterobacteriaceae	0	0%	0	0%	1	1%	1
30	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Enterobacteriaceae	0	0%	1	1%	0	0%	1
31	<i>Kluyvera ascorbata</i>	Enterobacteriaceae	0	0%	1	1%	0	0%	1
32	<i>Myroides odoratimimus</i>	Enterobacteriaceae	0	0%	1	1%	0	0%	1
33	<i>Pantoea dispersa</i>	Enterobacteriaceae	0	0%	0	0%	2	1%	2
34	<i>Pectobacterium betavascolorum</i>	Enterobacteriaceae	0	0%	0	0%	1	1%	1
35	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	Enterobacteriaceae	0	0%	1	1%	0	0%	1
36	<i>Serratia marcenscens</i>	Enterobacteriaceae	25	31%	37	21%	59	39%	121
37	<i>Serratia ureilytica</i>	Enterobacteriaceae	0	0%	0	0%	3	2%	3
38	<i>Yokenella regensburgei</i>	Enterobacteriaceae	0	0%	1	0%	0	0%	1
39	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Enterococcaceae	0	0%	4	2%	0	0%	4
40	<i>Microbacterium oxydans</i>	Microbacteriaceae	0	0%	0	0%	1	1%	1
41	<i>Microbacterium sp</i>	Microbacteriaceae	0	0%	1	1%	0	0%	1
42	<i>Kocuria rhizophila</i>	Micrococcaceae	0	0%	1	1%	0	0%	1
43	<i>Micrococcus luteus</i>	Micrococcaceae	0	0%	2	1%	0	0%	2
44	<i>Staphylococcus capitis</i>	Micrococcaceae	0	0%	0	0%	1	1%	1

"...continua..."

"Tabela 5, continua"

N°	Espécies	Família	Densidade de estocagem						
			4 px/m <sup>2</sup> *		8 px/m <sup>2</sup> **		10 px/m <sup>2</sup> ***		Total
45	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Micrococcaceae	0	0%	2	1%	0	0%	2
46	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Micrococcaceae	0	0%	6	3%	1	1%	7
47	<i>Arthrobacter creatinolyticus</i>	Micrococcaceae	0	0%	1	1%	5	3%	6
48	<i>Arthrobacter protophormiae</i>	Micrococcaceae	0	0%	1	1%	1	1%	2
49	<i>Psychrobacter sp</i>	Moraxellaceae	0	0%	1	1%	0	0%	1
50	<i>Pseudochrobactrum asaccharolyticum</i>	Pseudomonadaceae	0	0%	1	1%	0	0%	1
51	<i>Pseudomonas putida</i>	Pseudomonadaceae	0	0%	3	2%	0	0%	3
52	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Pseudomonadaceae	2	3%	0	0%	0	0%	2
53	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	Pseudomonadaceae	1	1%	0	0%	0	0%	1
54	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Xanthomonadaceae	2	3%	0	0%	0	0%	2
55	<i>Wohlfahrtiimonas chitiniclastica</i>	Xanthomonadaceae	0	0%	0	0%	1	1%	1
	Não identificados	-	6	8%	5	3%	10	7%	21
Total			80		177		150		407

(4px/m<sup>2</sup>)\* densidade de estocagem de quatro peixes por metro quadrado; (8px/m<sup>2</sup>)\*\* densidade de estocagem de oito peixes por metro quadrado; (10px/m<sup>2</sup>\*\*\* densidade de estocagem de dez peixes por metro quadrado.

Estudo realizado por Rebolças (2010) avaliando a microbiota bacteriana de estação de piscicultura marinha, observou grande diversidade de espécies heterotrófica, entre elas espécies do gênero *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Enterococcus* e *Staphylococcus*, assim como as encontrada no presente estudo, mostrando como é amplo os ambientes que ocorrem essa microbiota.

Conforme afirmam Allen e colaboradores (2004), os gêneros mais frequentes considerados como patógenos oportunistas no meio aquático e água potável para consumo são *Pseudomonas*, *Klebsiella*, e *Aeromonas*. Porém, estão relacionados com infecções hospitalares, sendo a via de transmissão os aparatos médicos e não a ingestão de água.

Uma das espécies bacterianas importante na água e em alimentos é a *Escherichia coli*, sua presença indica contaminação fecal por animal de sangue quente, além de expor os consumidores a micro-organismos potencialmente patogênicos (GASTALHO, SILVA e RAMOS, 2014). Nas amostras identificadas foram observadas apenas três isolados dessa espécie.

A baixa quantidade de isolados de *E. coli* pode ter sido pela não realização de técnica específica para determinação de coliformes totais e termotolerantes, bem como a perda na diversidade total pela manipulação dos isolados desde a quantificação até o isolamento para identificação. Mesmo sem esses dados, foi possível observar as várias representantes do grupo de coliformes totais, que fazem parte da família Enterobacteriaceae (Tabela 6).

Autores relatam a presença de quantidade significativa de coliformes termotolerante e totais, incluindo a *E. coli*, em amostras ambientais de seus achados (Martinhago et al., 2008; Rebolças, 2010; Souza et al., 2014).

Macedo (2004) observou alta população de coliformes termotolerantes em ambiente aquático que recebia fluxo intenso de efluentes de aquicultura, sugerindo a importância do tratamento desses efluentes antes de serem lançados no corpo receptor

Das famílias bacterianas representantes, a Enterobacteriaceae foi a que predominou dentre as diferentes densidades de estocagem, seguida pela Alcaligenaceae, mesmo sem ter representantes na densidade de estocagem de 10

peixes por m<sup>2</sup>. Algumas famílias obtiveram uma frequência de apenas 1%, como a Comamonadaceae, Brucellaceae e Moraxellaceae (Tabela 6).

**Tabela 6** - Frequência e Gram das famílias bacterianas em 407 isolados de diferentes densidades de estocagem de piscicultura.

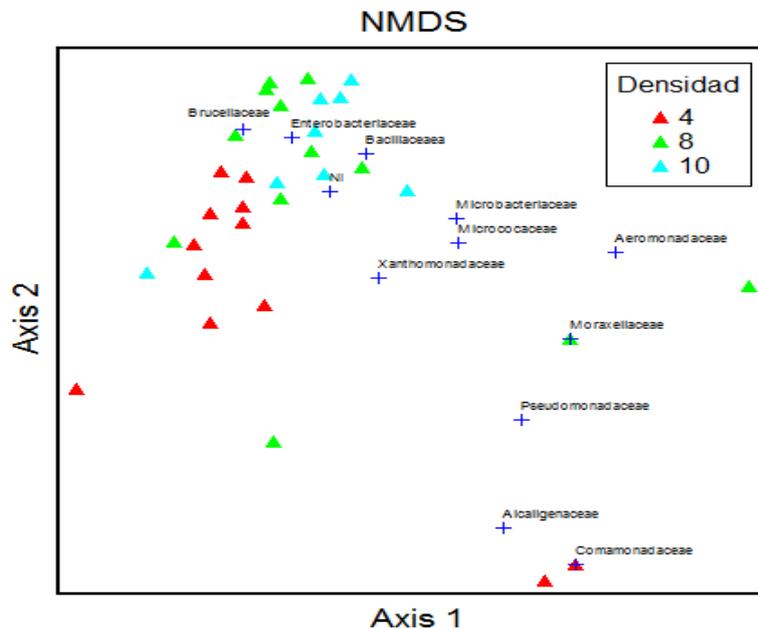
Família	Gram	Densidade de estocagem						
		4 px/m <sup>2</sup> *		8 px/m <sup>2</sup> **		10 px/m <sup>2</sup> ***		Total
Alcaligenaceae	-	18	23%	47	27%	0	0%	
Aeromonadaceae	-	0	0%	1	1%	1	1%	2
Micrococcaceae	+	0	0%	13	7%	8	5%	21
Bacillaceae	+	4	5%	8	5%	22	15%	34
Enterobacteriaceae	-	46	58%	96	54%	107	71%	249
Enterococcaceae	+	0	0%	4	2%	0	0%	4
Comamonadaceae	-	1	1%	0	0%	0	0%	1
Microbacteriaceae	+	0	0%	1	1%	1	1%	2
Brucellaceae	-	0	0%	1	1%	0	0%	1
Pseudomonadaceae	-	3	4%	4	2%	0	0%	7
Moraxellaceae	-	0	0%	1	1%	0	0%	1
Xanthomonadaceae	-	2	3%	0	0%	1	1%	3
Não identificadas	-	6	8%	5	3%	10	7%	21
<b>Total</b>		<b>80</b>		<b>177</b>		<b>150</b>		<b>407</b>

(4px/m<sup>2</sup>)\* densidade de estocagem de quatro peixes por metro quadrado; (8px/m<sup>2</sup>)\*\* densidade de estocagem de oito peixes por metro quadrado; (10px/m<sup>2</sup>\*\*\* densidade de estocagem de dez peixes por metro quadrado.

Estudo realizado por Conceição e colaboradores (2012) na piscicultura de Volta Grande da Companhia Energética de Minas Gerais, caracterizaram a diversidade de bactérias e observaram que a família Enterobacteriaceae foi a que apresentou maior frequência nos sistemas avaliados, corroborando com o presente trabalho. Segundo os autores supracitados, o elevado número de isolados dessa família é por ser considerada parte da microbiota de ambientes aquáticos.

O diagrama de ordenação da NMDS mostrou variação na composição da estrutura das famílias bacterianas entre as diferentes densidades de estocagem (Figura 5). A variação entre as famílias bacterianas apresentaram diferenças significativas pela MRPP em relação às densidades ( $A = 0.07$ ,  $p < 0.004$ ). A menor densidade de estocagem (4 px/m<sup>2</sup>) apresentou uma menor frequência de famílias

bacterianas. O que não ocorreu para os locais (montante, entrada saída e jusante) não havendo diferença significativa na frequência das famílias ( $A = -0.02$ ,  $p > 0.72$ ).



**Figura 5** - Diagrama de ordenação pelo método de escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) (stress=15,5).

Segundo Gastalho e colaboradores (2014), têm sido relatada o isolamento de diversos grupos bacterianos na aquicultura, porém possivelmente os das famílias Aeromonadaceae e Enterobacteriaceae são os mais pesquisados, visto que são potencialmente patogênicos.

#### 5.4 PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

Apesar das propriedades analisadas não fazer uso prévio de antimicrobianos, houve um grande número de isolados bacterianos resistentes, sugerindo a disseminação de genes de resistência no ambiente aquático (Tabela 7). Observou-se um maior número de resistência na densidade de 10 peixes por  $m^2$ , seguida da densidade de 8 peixes  $m^2$ , provavelmente pelo maior número de bactérias presentes nesses ambientes.

As bactérias apresentaram maior percentual de resistência principalmente a eritromicina, seguido da ampicilina. Dados do presente estudo corroboram com os de Carneiro e colaboradores (2007) e Lima e colaboradores (2005) que analisaram o perfil de resistência e observaram maior resistência a ampicilina e eritromicina.

A eritromicina faz parte da classe dos macrolídeos, é o mais conhecido em uso clínico. Seu modo de ação é inibindo a síntese proteica das bactérias, porém esse antibiótico não consegue penetrar na parede bacteriana da maioria dos bacilos Gram-negativos (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012).

**Tabela 7** - Frequência de resistência frente a antimicrobianos nos isolados microbianos, oriundos das amostras de água das diferentes densidades de estocagem.

Antimicrobianos	Densidade de estocagem		
	4 px/m <sup>2*</sup>	8 px/m <sup>2**</sup>	10 px/m <sup>2***</sup>
Gentamicina	4 5%	0 0%	0 0%
Sulfanamida	8 11%	12 7%	18 13%
Nitrofurantoína	42 57%	80 47%	27 19%
Eritromicina	46 62%	106 62%	117 84%
Ampicilina	41 55%	88 51%	94 67%
Tetraciclina	12 16%	22 13%	33 24%
Cloranfenicol	6 8%	3 2%	4 3%

(4px/m<sup>2</sup>)\* densidade de estocagem de quatro peixes por metro quadrado; (8px/m<sup>2</sup>)\*\*densidade de estocagem de oito peixes por metro quadrado; (10px/m<sup>2</sup>\*\*\* densidade de estocagem de dez peixes por metro quadrado. Número total de isolados bacterianos: 74 (4 px m<sup>2</sup>), 172 (8px m<sup>2</sup>) e 140 (10 px m<sup>2</sup>).

A gentamicina apresentou menor frequência de resistência, as demais bactérias presentes nas duas maiores densidades de estocagem foram sensíveis a este antimicrobiano. Os aminoglicosídeos como a gentamicina são muito eficientes contra bactérias Gram-negativas (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012). Dentre as dez famílias bacterianas, nove são de Gram-negativas, este pode ser um dos motivos da baixa resistência.

Outro antimicrobiano que teve uma baixa frequência de resistência foi o cloranfenicol. Esse composto apresenta amplo espectro de atividade, podendo ser

até tóxico para o hospedeiro (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012). Apenas oito isolados foram resistentes a ele.

Costa e colaboradores (2008) obtiveram em seu trabalho resultados em partes, semelhantes com o deste estudo, em que o cloranfenicol e a gentamicina apresentaram menor resistência frente aos isolados bacterianos. Porém, observaram alta sensibilidade na nitrofurantoína, diferindo do presente trabalho que apresentou resistência de média para alta.

No Brasil, tanto o cloranfenicol como a nitrofurantoina foram proibidos para uso na produção animal (MAPA 2002), apesar de terem sido eficazes contra uma quantidade de isolados estudados, especialmente da família Enterobacteriaceae.

Em relação às famílias bacterianas, a Enterobacteriaceae foi a que apresentou maior quantidade de espécies resistentes aos antimicrobianos. O perfil de resistência comprovou que a maioria dos isolados de bacilos Gram-negativo foram resistentes (Tabela 8).

**Tabela 8** - Perfil de resistência a antimicrobianos das famílias representantes dos isolados bacterianos, oriundos das amostras de água das diferentes densidades de estocagem.

Familia	Antimicrobianos							
	N° de isolados	Genta	Sulfa	Nitro	Eritro	Ampi	Tetra	Cloran
Aeromonadaceae	2	0	0	2	0	2	0	0
Alcaligenaceae	65	0	1	13	6	8	1	2
Bacillaceae	34	0	6	17	24	20	11	1
Brucellaceae	1	0	0	0	1	0	0	0
Comamonadaceae	1	1	0	1	1	1	0	0
Enterobacteriaceae	249	1	27	148	215	170	42	6
Enterococcaceae	4	0	1	2	3	0	2	0
Microbacteriaceae	2	0	0	1	1	0	0	0
Micrococcaceae	21	0	3	14	11	13	11	0
Moraxellaceae	1	0	0	1	0	0	0	0
Pseudomonadaceae	7	2	0	2	5	4	0	3
Xanthomonadaceae	3	0	1	2	2	2	1	0
N. I.	21	1	3	11	15	13	6	0
Total	407	5	41	212	281	233	72	12

Genta: gentamicina, Sulfa: sulfonamida, Nitro: nitrofurantoína, Eritro: eritromicina, Amp: ampicilina, Tetra: tetraciclina e Cloran: cloranfenicol. N.I.: não identificado

Os antimicrobianos testados são alguns dos apontados por pesquisas, que tem utilização tanto na aquicultura e outros sistemas de produção animal assim como na medicina humana.

O desenvolvimento de novas substâncias não são o suficiente para acompanhar a ligeira disseminação de bactérias resistentes, afetando drasticamente o futuro da terapia anti-infecciosa, especialmente as que ocorrem por amostras Gram-negativas (BOUCHER et al., 2009).

Segundo Gastalho e colaboradores (2014), a resistência aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos é um problema típico em Enterobacteriaceae por causa do espectro ampliado dessas enzimas que tem a capacidade de inativar grande parte desse grupo de antimicrobianos, dificultando no tratamento de infecções.

A presença desses agentes no meio aquático, além que causar problemas ambientais, pode contaminar carcaças e acabar entrando na cadeia alimentar por dispersão aumentando os problemas de saúde pública. O fenômeno dessa resistência em bactérias encontradas no ambiente aquático é observado nos mais diversos meios, como rios, lagoas, estuários, água potável, mar entre outros (OLIVEIRA, 2011). Indicando que a disseminação de bactérias e de genes de resistência não tem barreiras que os limitam.

Segundo Cabello (2006) o uso indiscriminado de agentes antimicrobianos na profilaxia e tratamento de infecções em aquicultura, aumentam as chances de contaminação ambiental, colocando em risco a saúde dos dos animais e principalmente do homem com bacterias resistentes.

## 5.5 PERFIL DE MÚLTIPLARRESISTÊNCIA

O índice de múltipla resistência aos antimicrobianos foi determinado em cada isolado bacteriano resistente. Dentre um total de 386 isolados bacterianos analisados, (374) 96 % apresentaram MAR acima de 0,2. Correspondendo a 44 espécies bacterianas, das 55 identificadas.

A espécie *Serratia marscencens* apresentou resistência a todos os antimicrobianos testados, seguida da *Citrobacter freundii* com multirresistência a seis dos sete antimicrobianos testados (Tabela 9).

**Tabela 9** - Perfil de múltipla resistência a antimicrobianos nos isolados microbianos, oriundos das amostras de água das diferentes densidades de estocagem.

Espécies	total isolados	Antimicrobianos							Índice MAR*
		G	S	N	E	A	T	C	
<i>A. spanius</i>	2	0	0	1	0	1	0	0	0,29
<i>A. hydrophila</i>	1	0	0	1	0	1	0	0	0,29
<i>A. veronii</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. faecalis</i>	63	0	1	14	8	11	1	2	0,71
<i>A. creatinolyticus</i>	6	0	0	2	3	3	5	0	0,57
<i>A. protophormiae</i>	2	0	0	1	1	2	0	0	0,43
<i>B. altitudinis</i>	2	0	0	2	2	1	2	1	0,57
<i>B. cereus</i>	4	0	1	1	3	4	1	0	0,71
<i>B. megaterium</i>	3	0	0	1	1	1	1	0	0,57
<i>B. pumilus</i>	15	0	0	4	8	9	6	0	0,57
<i>B. subtilis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. freundii</i>	27	1	5	11	25	9	5	0	0,86
<i>C. koseri</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. youngae</i>	1	0	0	1	1	0	0	0	0,29
<i>C. testosteroni</i>	1	1	0	1	1	1	0	0	0,57
<i>C. sakazakii</i>	1	0	1	0	1	1	0	0	0,43
<i>E. amnigenus</i>	3	0	0	0	2	1	1	0	0,43
<i>E. asburiae</i>	43	0	3	15	35	28	5	1	0,71
<i>E. cloacae</i>	10	1	1	3	6	6	0	0	0,71
<i>E. kobei</i>	18	0	0	6	17	9	1	0	0,57
<i>E. ludwigii</i>	2	0	1	2	2	2	2	0	0,71
<i>E. radicincitans</i>	2	0	0	1	2	2	0	0	0,43
<i>E. casseliflavus</i>	4	0	1	2	3	0	2	0	0,57
<i>E. coli</i>	3	0	0	3	2	3	2	2	0,71
<i>H. alvei</i>	1	0	0	0	1	1	0	0	0,29
<i>K. oxytoca</i>	1	0	0	0	1	1	0	0	0,29
<i>K. pneumoniae</i>	1	0	0	1	1	1	0	0	0,43
<i>K. ascorbata</i>	1	0	0	1	1	1	0	0	0,43
<i>K. rhizophila</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	0,57
<i>L. boronitolerans</i>	4	0	1	3	3	2	1	0	0,71
<i>L. fusiformis</i>	1	0	0	1	1	1	0	0	0,43
<i>L. sphaericus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. oxydans</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Microbacterium sp</i>	1	0	0	1	1	0	0	0	0,29

“...continua...”

"Tabela 9, continua"

Espécies	total isolados	Antimicrobianos							Índice MAR*
		G	S	N	E	A	T	C	
<i>M. luteus</i>	2	0	0	2	1	0	0	0	0,29
<i>M. odoratiminus</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	0,14
<i>O. grignonense</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	0,14
<i>P. glucanolyticus</i>	1	0	0	1	1	1	0	0	0,43
<i>P. dispersa</i>	2	0	0	2	2	0	0	0	0,29
<i>P. betavascolorum</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	0,14
<i>P. asaccharolyticum</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	0,14
<i>P. putida</i>	3	0	0	1	3	3	0	1	0,57
<i>P. mendocina</i>	2	1	0	1	1	2	0	0	0,57
<i>P. rhodesiae</i>	1	1	0	0	1	0	0	1	0,43
<i>Psychrobacter sp</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	0,14
<i>R. ornithinolytica</i>	1	0	0	1	1	1	0	0	0,43
<i>S. marcenscens</i>	121	1	15	100	108	103	24	4	1,00
<i>S. ureilytica</i>	3	0	0	0	3	2	0	0	0,43
<i>S. silvestris</i>	2	0	0	0	1	1	0	0	0,29
<i>S. capitis</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	0,57
<i>S. saprophyticus</i>	2	0	0	2	1	1	0	0	0,43
<i>S. xylosus</i>	7	0	1	4	3	3	6	0	0,71
<i>S. maltophilia</i>	2	0	1	2	2	1	1	0	0,71
<i>W. chitinoclastica</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	0,14
<i>Y. regensburgei</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	386	8	33	199	264	224	66	12	

G: gentamicina, S: sulfonamida, N: nitrofurantoína, E: eritromicina, A: ampicilina, T: tetraciclina e C: cloranfenicol. \*MAR acima de 0,2 caracteriza multirresistência.

De todas as espécies, apenas seis apresentaram-se sensível a todos os antimicrobianos testados e cinco apresentaram resistência apenas a um antimicrobiano.

A multirresistência baixa de algumas espécies bacterianas pode ser em virtude de ter um pequeno número de isolados representantes. Como é o caso da *Aeromonas veronii* que não apresentou resistência talvez por ter sido identificada apenas um isolado dessa espécie. Porém o único isolado de *Aeromonas hydrophila* foi resistente a dois antimicrobianos (ampicilina e nitrofurantoína).

Hirsch e colaboradores (2005) trabalhando com a identificação e resistência de *Aeromonas* em ambientes aquáticos, relataram que diversas espécies deste

gênero foram resistentes a vários antimicrobianos testado, inclusive a *Aeromonas veronni*.

Em trabalho realizado por Costa e colaboradores (2008) foi observado que isolados de *Aeromonas* spp apresentaram resistência a mais de um antimicrobiano.

Oliveira (2001), estudando o perfil de resistência de bactérias Gram-negativas, observou elevada resistência e multirresistências aos isolados identificados em água de superfície do rio Arroio Dilúvio, entre os gêneros, havia *Escherichia*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella* entre outras Gram-negativas. Mostrando a grande diversidade de bactérias resistentes e multirresistentes nos corpos hídricos.

A crescente resistência a vários agentes antimicrobianos tem sido uma preocupação para a comunidade científica, pois influenciam de forma negativa nas populações de outros organismos, alterando o equilíbrio ecológico (COSTA et al., 2008). Assim, a busca por alternativas que adotem medidas de manejo adequadas são essenciais para minimizar possíveis riscos ao ambiente e a saúde pública sem comprometer a produção na aquicultura (Cabello et al. 2006).

## 6 CONCLUSÃO

O estudo mostrou que a intensificação dos sistemas promoveu o aumento na população total de bactérias, porém sem relação com as variáveis físicas e químicas.

Dentre as variáveis físicas e químicas, somente a condutividade elétrica apresentou diferença significativa em relação as densidades de estocagem, sendo superior na maior densidade. As demais variáveis apresentaram diferenças significativas apenas para locais, com valores superiores no interior dos viveiros.

Foi identificada uma vasta diversidade de espécies bacterianas nas três densidades de estocagem, dentre elas, várias potencialmente patogênicas e oportunistas que podem causar sérias infecções humanas e animais.

A densidade de 4 peixes/m<sup>2</sup> apresentou uma menor frequência na composição das estruturas das famílias bacterianas.

A maioria dos isolados bacterianos presentes nos ambientes estudados apresentou alto índice de resistência e múltipla resistência aos antimicrobianos testados.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, W. R. Megacities as sources for pathogenic bacteria in rivers and their fate downstream. **International Journal of Microbiology** v. 2011, p. 1-14, 2011. <Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2011/798292>>. Acesso em: 08 jan. 2015.
- AKINBOWALE, O. L.; PENG, H.; BARTON M. D. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. **Journal of Applied Microbiology** v.100, p. 1103–1113, 2006.
- AKINBOWALE, O. L.; PENG, H.; GRANT, P.; BARTON, M. D. Antibiotic resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, n. 30, p. 177-182, 2007.
- ALVES, J. M. C.; FRASCA-SCORVO, C. M. D; SCORVO FILHO, J. D.; LARA, L. B.; CASEIRO, A.; ROMERO, S.; MELLO, R. F. Segurança alimentar na produção de organismos aquáticos. **Feed & Food**, v.1, n.4, p.16-23. 2006.
- ALLEN, M. J.; EDBERG, S. C.; REASONER, D. J. Heterotrophic plate count bacteria—what is their significance in drinking water. **International Journal of Food Microbiology**, Geneva, v. 92, p. 265– 274, 2004.
- ALY, S. M.; ALBUTTI, A. Antimicrobials use in aquaculture and their public health impact. **Aquaculture Research & Development**. v. 5, n 4, 2014.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21 ed. New York, 2005, 1368 p.
- AMÉRICO, J. H. P.; TORRES, N. H.; MACHADO, A. A.; CARVALHO, S. L. Piscicultura em tanques-rede: impactos e consequências na qualidade da água. **Revista Científica ANAP Brasil**. v. 6, n. 7, p. 137-150, jul. 2013.
- ANDRADE, V. C.; ZAMPIERI, B. B.; BALLESTEROS; E. R.; PINTO, A. B.; OLIVEIRA, A. J. F. C. Densities and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from marine waters and beach sands. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 342, p. 2-10, 2015.
- ANTONIO, N. S.; OLIVEIRA, A. C.; CANESINI, R.; ROCHA, J. R. PEREIRE, R. E. P. Mecanismos de resistência bacteriana. **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária**, v., n. 12, p., 2009.
- AUBRY-DAMON, H.; GRENET, K.; SALL-NDIAYE, P.; CHE, D.; CORDEIRO, E.; BOUGNOUX, M.E.; RIGAUD, E.; STRAT, Y. L.; LEMANISSIER, V.; ARMAND-LEFÈVRE, L.; DELZESCAUX, D.; DESENCLOS, J. C.; LIÉNARD, M.; ANDREMONT, A. Antimicrobial Resistance in Commensal Flora of Pig Farmers. **Emerging Infectious Diseases**. v. 10, n. 5, p. 873-879, maio. 2004.

BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L.; CANTÓN R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, p. 260–265, 2008.

BARROS, F. G. N.; AMIN, M. M. Água: um bem econômico de valor para o Brasil e o mundo. **Revista Brasileira de Gestão e Desenvolvimento Regional**, Taubaté, v. 4, n. 1, p. 75-108, jan./abr. 2008.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.

BOUND, J. P.; KITSOU, K.; VOULVOULIS, N. Household disposal of pharmaceuticals and perception of risk to the environment. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 21, p. 301–307, 2006.

BONELLI, R. R.; MOREIRA, B. M.; PICÃO, R. C. Antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae in South America: History, current dissemination status and associated socioeconomic factors. **Drug Resistance Updates**. Rio de Janeiro, v. 17, p. 24–36, 2014.

BORGHETTI, J. R.; SILVA, U. A. T. Principais sistemas produtivos empregados comercialmente. In: OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. (Org.). **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília, 2008. p.73-94.

BORRELY, S. I.; CAMINADA, S. M. L.; PONEZI, A. N.; SANTOS, D. R.; SILVA, V. H. O. Contaminação das águas por resíduos de medicamentos: ênfase ao cloridrato de fluoxetina. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v. 36, n. 4 p. 556-563. 2012.

BOUCHER, H.W., TALBOT, G.H., BRADLEY, J.S., EDWARDS, J.E., GILBERT, D., RICE, L.B., SCHELD, M., SPELLBERG, B., BARTLETT, J. Bad bugs, no drugs: no escape! An update from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, 48, 1–12. 2009.

BOYD, C.E.; SCHIMITTOU, H.R. Achievement of sustainable aquaculture through environmental management. **Aquaculture Economics & Management**, v.3, n.1. p.59-69, 1999.

Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 38 de 08 de Maio de 2002. Proíbe a fabricação, a importação e a comercialização de cloranfenicol, de nitrofuranos e de produtos que contenham estes princípios ativos, para uso em preparação de insumos utilizados na pecuária nacional. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, Distrito Federal, Seção 1, 2002, p. 9. 2002.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, Distrito Federal, 17 de março de 2005.

BRUMANO, G.; GATTÁS, G. Implicações sobre o uso de antimicrobianos em rações de monogástricos. **Revista Eletrônica Nutritime**, Viçosa, v. 6, n. 3, p. 953-959, 2009.

CABELLO, F.C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology**, Valhalla, v. 8, n. 7, p.1137-1144, 2006.

CALAMARI, D.; ZUCCATO, E.; CASTIGLIONI, S.; BAGNATTI, R. & FANELLI, R. Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po e Lombo in northern Italy. **Environmental Science & Technology**, Milan, v. 37, n. 7, p. 1241-1248, 2003.

CANAL, N. Caracterização de resistencia a antimicrobianos e diversidade genética em *Escherichia coli* isolada de amostra de água da Lagoa dos Patos, RS. 2010. 98 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) Instituto de Ciência Básica da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande de Sul, Porto Alegre. 2010.

CARNEIRO, D. O.; FIGUEIREDO, H. C. P.; JÚNIOR, D. J. P.; LEAL, C. A. G.; LOGATO, P. V. R. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas em diferentes sistemas de cultivo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Lavras, v.59, n.4, p.869-876, 2007.

CARVALHO, R. G. C.; CARNEIRO, I. C. R. S.; PINHEIRO, M. S.; PINHEIRO, S. C.; AZEVEDO, P. S. R.; SANTOS, S. D.; COSTA, A. R. F.; RAMOS, F. L. P.; LIMA, K. V. B.. Caracterização fenotípica e genotípica de *Serratia marcescens* provenientes de Unidade Neonatal de Referência em Belém, Pará, Brasil. **Revista Pan-Amaz saúde**, Ananindeua, v. 1, n. 1, p. 101 – 106, 2010.

CASTELLANI, D. E. BARRELA, W. Impactos da atividade de piscicultura na Bacia do Rio Ribeira de Iguape. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 2, p.161-171, jan/fev. 2005.

CASTILHO, G. G.; PEREIRA, L. A.; PIE, M. R. Aquicultura, segurança alimentar sanidade e meio ambiente. In: OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. (org.). **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília, 2008, p. 73-94.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão**; Norma Aprovada—Oitava Edição. CLSI document M2-A8. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; v. 23, n. 1, 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Twenty-second Informational Supplement. CLSI document M100-S22. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; v. 32, n. 3, 2012.

CONCEIÇÃO, C.; OLIVEIRA, A. G.; OLIVEIRA, R. V.; JUNIOR, L. C. F.; SILVA, P. R.; TEIXEIRA, M. M.; RIBEIRO, D. C.; PELLI, A. Variação espacial e sazonal de micro-organismos associados ao cultivo do Zungaro jahu (Ihering, 1898), na Estação Ambiental de Volta Grande no Estado de Minas Gerais. **Journal of Health Sciences Institute**, Uberaba, v. 30 n. 2 p.186-189. 2012.

CREPALDI, D. V.; TEIXEIRA, E. A.; FARIA, P. M. C.; RIBEIRO, L. P.; MELO, D. C.; CARVALHO, D.; SOUSA, A. B.; SATURNINO, H. M.. Sistemas de produção na piscicultura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 30, n. 3/4, p.86-99, jul./dez. 2006.

CYRINO, J. E. P.; BICUDO, Á. J. A.; SADO, R. Y.; BORGHESI, R.; DAIRIKI, J. K. A piscicultura e o ambiente – o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, suplemento especial, p.68-87, 2010.

DAL PUPO, H. D. **Diversidade da microbiota Gram-negativa em sistemas de cultivo de tilápia-do-nilo (*oreochromis niloticus*)**. 2006, 42 p. Dissertação (Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2006.

DÍAZ-CRUZ, M. S.; ALDA, M. J. L. e BARCELÓ, D. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. **Trends in Analytical Chemistry**, Barcelona, v. 22, n. 6, p. 340-351, 2003.

EICKHOFF, P.; HEINECK, I.; SEIXAS, L. J. Gerenciamento e destinação final de medicamentos: uma discussão sobre o problema. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 90, n. 1, p. 64-68, 2009.

ELER, M. N.; MILLANI, T. J. Métodos de estudos de sustentabilidade aplicados a aquicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, São Carlos, v.36, suplemento especial, p. 33-44, 2007.

FIGUEIREDO, H. C. P; LEAL, C. A. G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. suplemento especial, p. 08-14, 2008.

GALLERT, C.; FUND, K., WINTER, J. Antibiotic resistance of bacteria in raw and biologically treated sewage and in groundwater below leaking sewers. **Applied microbiology and biotechnology**, 2005 v. 69, n. 1, p. 106 -112, 2005.

GASTALHO, S.; SILVA, G. J.; RAMOS, F. Uso de antibióticos em aquicultura e resistência bacteriana: Impacto em saúde pública. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, Coimbra, v. 3, n. 1, p. 29-45, 2014.

GOLL, A. S.; FARIA, M. G. I. Resistência bacteriana como consequência do uso inadequado de antibióticos. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, Maringá, v.5, n.1, p.69-72, fev. 2014.

GOÑI-URRIZA, M.; CAPDEPUY, M.; ARPIN, C. RAYMOND, N.; CAUMETTE, P.; QUENTIN, C. Impact of an Urban Effluent on Antibiotic Resistance of Riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, Jan. 2000, p. 125–132. 2000.

GORDON, L.; GIRAUD, E.; GANIERE, J. P.; ARMAND, F.; BOUJU-ALBERT, A.; DE LA COTTE N.; MANGION C.; LE BRIS H. Antimicrobial resistance survey in a river receiving effluents from fresh water fish farms. **Journal of Applied Microbiology**, v.102, n. 4, p.1167-1176, abr. 2007.

GOTELLI, N. J.; ELLISON, A. M. **Princípios de estatística em ecologia**. Tradução: Fabrício Beggiato Baccaro. Porto Alegre, Artmed, 2011. 683p.

GRADVOHL, S. T. S.; SILVA, M. E. R.; NETO, F. C.; NUNES, I. V.; AQUINO, M. D. **Avaliação da qualidade das águas na região metropolitana de Fortaleza-CE: Estudo de caso dos açudes Gavião, Pacoti e Riachão**. In: Simpósio brasileiro de recursos hídricos, 17. 2007. São Paulo: ABRH, 2007. p. 1-20.

GUARDABASSI, L.; JENSEN, L.B.; KRUSE, H. **Guia de antimicrobianos em veterinária**. Porto Alegre: Artmed, 2010, p. 267.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GUO, L.; LI, Z. Effects of nitrogen and phosphorus from fish cage-culture on the communities of a shallow lake in middle Yangtze River basin of China. **Aquaculture**, v. 226, p. 201–212, 2003.

HENRY-SILVA, G. G.; CAMARGO, A. F. M. Impacto das atividades de aquicultura e sistemas de tratamento de efluentes com macrófitas aquáticas – relato de caso. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 163-173, 2008.

HERNANDO, M. D.; MEZCUA, M.; FERNÁNDEZ-ALBA A. R.; BARCELÓ, D. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface water sand sediments. **Talanta**, Almería, v. 69, p. 334–342, 2006.

HEUER, O. E.; KRUSE, H.; GRAVE, K.; COLLIGNON, P.; KARUNASAGAR, I.; ANGULO, F. J. Human Health Consequences of Use of Antimicrobial Agents in Aquaculture. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 8, p.1248-1253, set. 2009.

HIRSCH, D.; JUNIOR, D. J. P.; LOGATO, P. V. R.; PICCOLI, R. H.; FIGUEIREDO, H. C. P. Identificação e resistência a antimicrobianos de espécies de aeromonas móveis isoladas de peixes e ambientes aquáticos. **Revista de Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1211-1217, 2006.

HUANG, J. Q.; LIU, Z.; WANG, J. F.; LI, Y. J. Bacterial diversity in saline-alkali ponds rearing common carp (*Cyprinus carpio*) as revealed by 16S rRNA gene sequences. **Biologia**, v. 69, n.6, p.727-734, jun 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.2478%2Fs11756-014-0378-4#page->>. Acesso em: 18 nov. 2014.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Produção da Pecuária Nacional. 2014. Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, v. 25, 2005. Disponível em: <<http://censo2010.ibge.gov.br/noticias?view=noticia&id=1&idnoticia=2795&busca=1&t=ppm-2013-investiga-pela-1-vez-aquicultura-nacional>> . Acesso em: 20 mar. 2015.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Mapa do estado do Paraná. Disponível em: <<http://cod.ibge.gov.br/232D6>>. Acesso em: 8 abr. 2015.

JÚNIOR, D. J. P.; FIGUEIREDO, H. C. P.; CARNEIRO, D. O.; LEAL, C. A. G. Concentração inibitória mínima de oxitetraciclina para isolados de *Aeromonas Hydrophila* obtidos de diferentes fontes, **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1190-1195, Nov/dez. 2006.

KAHVECI, A.; ASICIOGLU, E.; TIGEN, E.; ARI, E.; ARIKAN, H.; ODABASI, Z.; OZENER, C. Unusual causes of peritonitis in a peritoneal dialysis patient: *Alcaligenes faecalis* and *Pantoea agglomerans*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.10, n.12, p.1-3, abr. 2011.

KRUMMENAUER D.; PEIXOTO, S.; CAVALLI, R.O., WASIELESKY, W.; POERSCH, L.H. Superintensive Culture of White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in a Biofloc Technology System in Southern Brazil at Different Stocking Densities. *Journal of the world Aquaculture Society*, v.42, n.5, p.726-733, 2011.

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

KUBITZA, F. **Qualidade da água na produção de peixes**. 3 ed. Jundiaí: Divisão de Biblioteca e Documentação – Campus Luiz de Queiroz/ USP. 1999. 97 p.

KUBITZA, F. Adubação de viveiros e produção de tilápia. In: Kubitza F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiaí: Degaspari, 2000. p.49-76.

KUBITZA, F. A versatilidade do sal na piscicultura. **Panorama da aquicultura**. p. 1-7, 2007. Disponível em: <[http://www.bettabrasil.com.br/downloads/uso do sal na piscicultura.pdf](http://www.bettabrasil.com.br/downloads/uso%20do%20sal%20na%20piscicultura.pdf)>. Acesso em: 10 out. 2014.

KUBITZA, F. Sanidade aquícola. **Panorama da aquicultura**. v. 18, n. 107, p. 1-8, 2008.

- KUBITZA, F. O status atual e as tendências da tilapicultura no Brasil. **Panorama da aquicultura**, v.21, n.124, p.10-19, mar./abr. 2011.
- KUMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. **Chemosphere**, Freiburg, n. 75, v. 4, p. 417–434, 2009.
- LIM, K.T.; YASIN,R.; YEO, C.C.; PUTHUCHEARY, S.; THONG, K. L. Characterization of multidrug resistant ESBL-producing *Escherichia coli* Isolates from hospitals in Malaysia. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. v. 2009, n. 165637, p. 1-10. 2009.
- LIMA, R. M. S.; FIGUEIREDO, H. C. P.; FARIA, F. C.; PICOLLI,R. H.; LOGATO, J. S. S. B.; FILHO, P. V. R. Resistência a antimicrobianos de bactérias oriundas de ambiente de criação e filés de tilápias do Nilo (*oreochromis niloticus*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 1, p. 126-132, jan./fev., 2006.
- LIMA-BITTENCOURT, C.I.; CURSINO, L.; GONÇALVES-DORNELAS, H.; PONTES, D.S.; NARDI, R.M.D.; CALLISTO, M.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A.M.A. Multiple antimicrobial resistance in enterobacteriaceae isolates from pristine freshwater. **Genetics and Molecular Research**, v.6, n. 3, p. 510-521, 2007.
- LIMA, W. S.; GARCIA, C. A. B. Qualidade da Água em Ribeirópolis - SE: O Açude do Cajueiro e a Barragem do João Ferreira. **Scientia Plena**, São Cristovão, v. 4, n. 12, p.12240-12264, 2008.
- LOPES, R. B.; OLINDA, R. A.; SOUZA, B. A. I.; CYRINO, J. E. P.; DIAS, C. T. S.; QUEIROZ, J. F.; TAVARES, L. H. S. Efficiency of bioaugmentation in the removal of organic matter in aquaculture systems. **Brazilian of Journal Biology**, Santarém, v.71, n.2, 2011
- MACEDO, C. F. **Qualidade da água em viveiros de criação de peixes com sistema de fluxo contínuo**. 2004. 150 f. Tese (Doutorado em aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- MACEDO, C. F.; TAVARES, L. H. S. Eutrofização e qualidade da água na piscicultura: consequências e recomendações. **Boletim Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 36, n.2, p. 149 – 163, 2010.
- MACKERETH, F.Y.H; HERON, J.G.; TALLING, J.J. Water analysis some revised methods for limnologist. Ambleside: Freshwater Biological Association. **Freshwater Biological Association. Scientific Publication**, v. 36, p. 120, 1978.
- MARENGONI, N. G. Produção de tilápia do Nilo *oreochromis niloticus* (linhagem chitralada), cultivada em tanques-rede, sob diferentes densidades de estocagem. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 55, n. 210, p. 127-138, jun, 2006.

MARIPÁ. Prefeitura Municipal. **Histórico do município de Maripá**. 2013. Disponível em: <<http://www.maripa.pr.gov.br/artigo/129/Historico-do-municipio-de-Maripa/231>>. Acesso em: 12 fev. 2015.

MARIPÁ. Prefeitura Municipal. **Principais atividade econômicas do município**. 2014. Disponível em: <<http://www.maripa.pr.gov.br/artigo/131/Principais-atividades-e-economicas-do-municipio/673>>. Acesso em: 15 fev. 2015.

MARSHALL, B. M.; LEVY, S. B. Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. **Clinical Microbiology Reviews**, Boston, v. 24, n. 4, p. 718–733. out. 2011.

MARTINEZ, J. L. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. Proceedings - **Royal Society. Biological sciences**. v. 276, p. 2521–2530, 2009.

MARTINHAGO, M.W.; BUZANELLO, E.B.; ALMEIDA, M.M.; PINTO, F.G.S. Avaliação do perfil de susceptibilidade das cepas de *Escherichia coli* isoladas da água do lago municipal de Cascavel, Paraná. **Revista Brasileira de Biociências**, v.6, p.62-62, 2008.

MCCUNE, B.; J. B. GRACE. **Multivariate Analysis of Ecological Communities**. MjM Software Design, Gleneden Beach, Oregon, U.S.A., 2002.

MCCUNE, B.; M. J. MEFFORD. PC-ORD. **Multivariate Analysis of Ecological Data**. Version 5.31. MjM Software, Gleneden Beach, Oregon, U.S.A., 2006.

MENEGHINE, A. K. **Diversidade bacteriana em piscicultura neotropical**. 2013. 52 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista/Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2013.

MIAN, G. F. **Concentração inibitória mínima de oxitetraciclina e ácido oxolínico frente às aeromonas móveis na aquicultura**. 2006. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

MINUCCI, L. V.; PINESE, J. F.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Análise limnológica de sistema semi-intensivo de criação de *Leporinus macrocephalus* (Pisces, Anostomidade). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.21, n.1, p.123–131, 2005.

MIRANDA, C. D.; ZEMELMAN, R. Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from fresh water Chilean salmon farms. **Science of the Total Environment**, v.293, p.207-218, 2002.

MOTA, R. A.; SILVA, K. P. C.; FREITAS, M. F. L.; PORTO, W. J. N.; SILVA, L. B. G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

NEU, D. H.; BOSCOLO, W. R.; DIEMER, O.; CAMARGO, D. J.; WÄCHTER, N.; FEIDEN, A. Qualidade da Água em um Reservatório Neotropical Associado à Criação de Peixes em Tanques Rede: Reservatório de Itaipu. **Revista Agrarian**, Dourados, v. 7, n. 23, p. 139-146, 2014.

NIKAIDO, H. Multidrug Resistance in Bacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v.78, p.119-146. 2009.

OLIVEIRA, R. P. C.; SILVA, P. C.; PADUA, D. M. C.; AGUIAR, M.; MAEDA, H.; MACHADO, N. P.; RODRIGUES V.; SILVA, R. H. Efeitos da densidade de estocagem sobre a qualidade da água na criação do tambaqui (*Colossoma macropomum*, cuvier, 1818) durante a segunda alevinagem, em tanques fertilizados. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 4, p. 705-711, out./dez. 2007.

OLIVEIRA, D. V. **Avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias Gram-negativas isoladas nas águas do Arroio Dilúvio**. 2011. 84 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

Organization International des Epizooties (World Organization for Animal Health), World Health Organization, and Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2006. **Report of a joint FAO/OIE/WHO expert consultation on antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance** : Seoul, Republic of Korea, 13-16 June 2006.

OSTRENSKY, A.; BOEGER, W. **Piscicultura : fundamentos e técnicas de manejo**. Guaíba: Agropecuária, 1998. 211 p. Inclui índice. ISBN 85-85347-27-9

OSTRENSKY, A.; BOUER, W. A. Principais problemas enfrentados atualmente pela aquicultura brasileira. In: OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. (org.). **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília, 2008. 135-158 p.

PÁDUA, S. B.; FILHO, R. N. M.; CRUZ, C. Alevinos saudáveis: o ponto de partida para uma produção estável. **Panorama da Aquicultura**, 2012. Disponível em: <<http://www.panoramadaaquicultura.com.br/novosite/?p=1763>>. Acesso em: 15 set 2014.

PAGGI, L. C. **Avaliação limnológica em um sistema de piscicultura na região de paranaíta**. 2006. 43 f. Dissertação (Mestrado em aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

PARK, Y. H.; HWANG, S. Y.; HONG, M.K.; KWON, K.H. Use of antimicrobial agents in aquaculture. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties.**, v. 31, n.1, p. 189-197, 2012.

PEIXOTO, L. J. S. ;SÁ, M. C. A.;GORDIANO, L. A.;COSTA, M. M. *Aeromonas* spp.: fatores de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.79, n.3, p.453-461, jul./set. 2012.

PHAN-VAN, M.; ROUSSEAU, D.; PAUW, N. Effects of fish bioturbation on the vertical distribution of water temperature and dissolved oxygen in a fish culture-integrated waste stabilization pond system in Vietnam. **Aquaculture**, v. 281, p. 28-33. 2008.

PIDDOCK, L. J. V. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 382–402, abr. 2006.

PILLAY, T.V.R. **Aquaculture and the environment**. 2 ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2004. 94 p. Inclui índice. ISBN 1-4051-0167-9.

PRADO, T.; PEREIRA, W.C.; SILVA, D.M.; SEKI, L.M.; CARVALHO, A.P.D'A.; ASENSI, M.D. Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. **Letters in applied microbiology**, Rio de Janeiro, v. 46, n.1, p. 136 -141, jan. 2008.

REBOLÇAS, R. A. **Monitoramento da microbiota bacteriana da água de um sistema fechado de cultivo em uma estação de piscicultura marinha**. 2010. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

REGITANO, J. B; LEAL, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Piracicaba, v. 34, p. 601-616, 2010.

RIBEIRO, G. M.; MAIA, C. E.; MEDEIROS, J. F. Uso da regressão linear para estimativa da relação entre a condutividade elétrica e a composição iônica da água de irrigação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 9, n. 1, p. 15-22. 2005.

RUSU, A.; HANCU, G.; UIVAROSI, V. Fluoroquinolone pollution of food, water and soil, and bacterial resistance. **Environmental Chemistry Letters**, v. 13, p. 21–36, 2015. <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10311-014-0481-3>. Acesso em: 22 abr. 2015.

SENGELOV, G.; SORENSEN, S. J. Methods for detection of conjugative plasmid transfer in aquatic environments. **Current Microbiology**, Copenhagen, v.37, p.274-280, 1998.

SERAPICOS, E. S. A. C. **Prevalência da resistência a antibióticos, metais e desinfetantes em isolados de staphylococcus provenientes de uma etar municipal**. 2008. 97 f. Dissertação (Mestrado em engenharia Ambiental) – Universidade do Porto/ Faculdade de engenharia, Porto, 2008.

SILVA, R. M. L. **Bactérias do gênero *Aeromonas* e indicadores de qualidade da água em pisciculturas da região da baixada ocidental maranhense**. 2010. 75f.

Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

SILVA, D. B. **Comunidade bacteriana em viveiros de aquicultura**. 2014. 59f. **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal, 2014.

SMITH, P. R.; BRETON, A. L.; HORSBERG, T. E.; CORSIN, F. Guidelines for antimicrobial use in aquaculture. In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. (Ed.). **Guide to antimicrobial use in animals**. Oxford: Willey Black well, 2008. p. 207-216.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; LOURENÇO, E. M.; BRAGA, F. M. S. Water quality in six sequentially disposed fishponds with continuous water flow. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 32, n. 1, p. 9-15, 2010.

SOUZA, R. M. R. **Qualidade da água e desempenho reprodutivo da tilápia do Nilo alimentada em diferentes freqüências e períodos por meio do dispensador automático**. 2007. 71f. **Dissertação** (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista/Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2007.

SOUZA, M.; PINTO, F.G.S.; FRUET, T. K.; PIANA, P. A.; MOURA, A. C. water quality indicators for environmental and resistance profile of *escherichia coli* strains isolated in rio cascavel, paraná, brazil. **Revista Engenharia Agrícola**, v.6, p.62-62, 2008.

STATSOFT, INC. 2005. **Statistica** (data analysis software system), version 7.1. Disponível em: <www.statsoft.com>. Acesso em: 4 mar. 2015.

STRICKLAND, J. D. H.; PARSONS, T. R. **A practical handbook of sea water analysis**. 2 ed. Ottawa: Fish Research Board of Canada, 1972.

TAMMINEN, M.; KARKMAN, A.; CORANDER, J.; PAULIN, L.; VIRTA, M. Differences in bacterial community composition in Baltic Sea sediment in response to fish farming. **Aquaculture**, Helsinki, v. 313, p.15–23, 2011.

TANAKA, K.; WAKI, H.; IDO, Y.; AKITA, S.; YOSHIDA, Y.; YOSHIDA, T. Protein and polymer analyses up to mlz 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Osaka, v. 2, n. 8, p. 151-153, 1998.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012, 934 p.

VAZ, E. K. Resistência antimicrobiana: como surge e o que representa para a Suinocultura. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 37, (Supl1), p.147-150, 2009.

ZENG, Y.; MA, Y.; WEI, C.; JIAO, N.; TANG, K.; WU, Z.; JIAN, J. Bacterial diversity in various coastal mariculture ponds in Southeast China and in diseased eels as revealed by culture and culture-independent molecular techniques. **Aquaculture Research**, Guangdong, v. 41, p. 172-186, 2010.

ZIMMERMANN, S.; FITZSIMMONS, K. Tilapicultura intensiva. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: Tec Art, 2004, 249-254p.

ZUCCATO, E.; CASTIGLIONI, S.; FANELLI, R.; REITANO, G.; BAGNATI R.; CHIABRANDO, C.; POMATI, F.; ROSSETTI, C.; CALAMARI, D. Pharmaceuticals in the environment in Italy: causes, occurrence, effects and control. **Environmental Science and Pollution Research**, v.13, n.1, p.15-21, 2006.