

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

MARLISE TERESINHA MAUERWERK

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E PERFIL DE RESISTÊNCIA A
ANTIBIÓTICOS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO INTESTINO DE PEIXES E
DA ÁGUA ORIUNDOS DE AMBIENTES NATURAIS E DE CRIAÇÃO**

CURITIBA

2012

MARLISE TERESINHA MAUERWERK

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E PERFIL DE RESISTÊNCIA A
ANTIBIÓTICOS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO INTESTINO DE PEIXES E
DA ÁGUA ORIUNDOS DE AMBIENTES NATURAIS E DE CRIAÇÃO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Escola de Medicina, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Humberto Maciel França
Madeira

CURITIBA

2012

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

M448i
2012

Mauerwerk, Marlise Teresinha
Isolamento, identificação e perfil de resistência a antibióticos de bactérias isoladas do intestino de peixes e da água oriundos de ambientes naturais e de criação / Marlise Teresinha Mauerwerk ; orientador: Humberto Maciel França Madeira. – 2012.
94 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2012
Bibliografia: f. 79-94

1. Agentes antiinfeciosos. 2. Resistência microbiana a medicamentos.
3. Antibióticos. I. Madeira, Humberto Maciel França. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
III. Título.

CDD 20. ed. – 615.329



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos treze dias do mês de setembro de 2012, realizou-se a sessão pública de defesa de dissertação "ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO INTESTINO DE PEIXES E DA ÁGUA ORIUNDOS DE AMBIENTES NATURAIS E DE CRIAÇÃO" apresentada por **MARLISE TERESINHA MAUERWERK** para obtenção do título de mestre; Área de Concentração: Medicina e áreas afins.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Humberto Maciel França Madeira PUCPR – Presidente	
Prof. Dr. Sergio Surugi de Siqueira PUCPR	
Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz UFPR	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Humberto Maciel França Madeira

Conceito: Aprovado

Prof. Dr. Sergio Surugi de Siqueira

Conceito: Aprovado

Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz

Conceito: Aprovado

Conceito Final: APROVADO

Observações da Banca Examinadora:

Considerar as sugestões na entrega de
versos finais.

Prof. Dr. Humberto Maciel França Madeira
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Roberto Pecoits Filho
Coordenador do PPGCS PUCPR

Dedico esse trabalho aos meus pais,
Laurindo e Emília, meus irmãos Valdecir e
Maurício, meu esposo Fábio, e,
principalmente, minha filha Kelly.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pelo refúgio, pela fonte de esperança e força nas horas mais difíceis.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Humberto Maciel França Madeira, pela oportunidade única oferecida para o ingresso no mestrado, pelos conhecimentos compartilhados, por todas as orientações e pelos exemplos de humildade, ética e sabedoria.

Ao CNPq, pela disponibilização da bolsa e pelo financiamento do projeto.

A minha família, em especial aos meus pais Laurindo e Emília, e irmãos Valdecir e Maurício, pelo incentivo na realização do mestrado e pelo imenso apoio, confiança e amor dedicados a mim, além do grandioso exemplo de vida e de perseverança que são.

A minha sogra Marli, por ter assumido os cuidados e a educação de minha filha de forma excepcional e pelo imenso apoio em todos os momentos.

Ao meu esposo Fábio e minha filha Kelly, razão principal da realização desse trabalho, por entenderem e aceitarem as circunstâncias impostas e pelo amor incondicional e sincero demonstrado.

A todos os estagiários do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Agropecuária que me auxiliaram na realização do trabalho e também pela amizade, em especial a Elori Mieko Oikawa, pelo auxílio em todas as etapas do trabalho, pela companhia nas coletas e nos momentos de dificuldades e pela amizade.

A Jussara Kasuko Palmeiro do Hospital de Clínicas da UFPR pelas preciosas dicas na execução do trabalho e pela disponibilização de algumas cepas bacterianas.

Aos funcionários do Setor de Piscicultura da PUC, em especial ao Jorge Mikos, César e ao professor Peter, pelo auxílio na coleta das amostras.

As professoras Márcia Olandoski e Cláudia Pimpão pelo imenso auxílio na realização das análises estatísticas.

A todos os funcionários dos laboratórios da PUC de São José dos Pinhais que me auxiliaram.

A todos os professores do mestrado em Ciências Animal e do mestrado em Ciências da Saúde que me auxiliaram no desenvolvimento intelectual.

As secretárias dos mestrados acima citados, pela disposição e auxílio sempre que solicitadas.

Aos professores que participaram das minhas bancas nos seminários júnior e sênior, na qualificação e na defesa pelas importantes contribuições.

A Kárita Freitas Lidani, pelo auxílio no desenvolvimento do projeto e pela amizade.

A Bruna Klein e Thalita Aires Nascimento, pela ótima companhia e amizade durante esse período de convivência e divisão de moradia, pelas longas conversas durante as noites e finais de semana.

A todos que me ajudaram direta ou indiretamente, minha eterna gratidão. Sem vocês não seria possível à concretização de mais essa etapa da minha vida.

"Se eu vi mais longe, foi por estar de pé
sobre ombros de gigantes."

Isaac Newton

RESUMO

O amplo uso de antibióticos na medicina humana e animal, bem como o uso desse fármaco como promotor de crescimento para animais de produção tem resultado no aumento do número de bactérias comensais e patogênicas resistentes aos antimicrobianos, o que vem se tornando um dos maiores problemas de saúde pública atualmente. Sendo assim, acredita-se que o conhecimento do perfil das populações microbianas do trato digestivo de peixes, bem como o monitoramento de genes de resistência a antibióticos contidos nestas populações podem servir como subsídio para a utilização da microflora gastrointestinal de peixes como bioindicadores da carga de utilização de antibióticos pela população em uma dada região. Para isso, foram realizadas coletas de peixes e água em quatro locais com diferentes níveis de ação antrópica. A partir do intestino dos animais coletados, procedeu-se o isolamento e a identificação bacteriana com auxílio de kits comerciais, bem como identificação genotípica através de seqüenciamento do DNA bacteriano através do gene RNAr 16S. Em seguida, as colônias identificadas por kits comerciais foram submetidas ao teste de resistência aos antibióticos, pela técnica de Kirby-bauer, onde foram testados 10 antibióticos. Com as coletas realizadas foi possível a captura de 36 animais, sendo eles jundiás, carpas e acáras. A partir do intestino destes peixes e das amostras de água, foram isoladas 320 colônias bacterianas, das quais 130 puderam ser identificadas. Destas, as famílias bacterianas isoladas com maior frequência foram *Aeromonadaceae* e *Enterobacteriaceae*. Já com a realização da identificação pelo sequenciamento do gene RNAr, 16S foi possível a identificação de 253 colônias bacterianas, sendo que a maioria dos isolados são pertencentes as famílias *Aeromonadaceae* e *Enterobacteriaceae*. Quanto ao teste de resistência aos antibióticos, o antibiótico que apresentou maior número de cepas resistentes foi a ampicilina, enquanto o cefepime não apresentou nenhuma cepa resistente. Já a família bacteriana que apresentou maior frequência de resistência foi a *Pleisiomonadaceae*. Referente ao ponto de coleta, os locais que apresentaram maior frequência de resistência foram o LAPEP e o rio Barigui, demonstrando que o nível de poluição pode estar relacionado ao nível de resistência apresentado, e o peixe que parece ser o melhor para ser utilizado como bioindicador é o jundiá, o que pode ser atribuído ao seu hábito alimentar. Além disso, com os resultados obtidos na identificação bacteriana, percebe-se que a técnica mais eficaz foi a genotípica, comprovando que as metodologias moleculares estão revolucionando os conhecimentos até então tidos de microbiologia, pois muitos microrganismos que não podem ser cultivados em laboratório, podem ser identificados através dessas técnicas.

Palavras-chaves: Peixe, bioindicador, resistência a antimicrobianos.

ABSTRACT

The widespread use of antibiotics in human and veterinary medicine, as well as the use of this drug as a growth promoter for livestock has resulted in increased numbers of commensal and pathogenic bacteria resistant to antimicrobials, which has become one of the biggest problems public health today. Thus, it is believed that knowledge of the profile of microbial populations in the digestive tract of fish, as well as the monitoring of the antibiotic resistance genes contained in these populations may serve as a support for the use of fish gastrointestinal microflora as bioindicators load use of antibiotics by the population in a given region. For this, samples were taken from fish and water at four sites with different levels of human action. From the intestine of animals collected, proceeded to the isolation and identification of bacteria with the aid of commercial kits, as well as genotypic identification by sequencing of bacterial DNA by 16S rRNA gene. Then the colonies were identified by commercial kits to test for antibiotic resistance, by the Kirby-Bauer technique, in which 10 antibiotics were tested. With the collections was made possible the capture of 36 animals, namely silver catfish, carp and acara. From the intestine of the fish and the water samples, 320 bacterial colonies were isolated, 130 of which were identified. Of these, the bacterial families were most frequently isolated was Aeromonadaceae and Enterobacteriaceae. Now with the completion of the identification by sequencing gene 16S rRNA, was possible the identification of 253 bacterial colonies, and most isolates are belonging families Aeromonadaceae and Enterobacteriaceae. How to test antibiotic resistance, antibiotic with the highest number of resistant strains was ampicillin, cefepime while showed no resistant strain. Already a bacterial family that showed a higher frequency of resistance was Pleisiomonadaceae. Referring to the collection point, the locations with the highest frequency of resistance were LAPEP and river Barigui, demonstrating that the level of pollution can be related to the level of resistance displayed, and the fish that seems to be the best to be used as bioindicator is catfish, which can be attributed to their eating habits. Moreover, the results obtained with the bacterial identification, it is clear that the most effective technique was the genotype, confirming that molecular methods are revolutionizing knowledge hitherto taken microbiology because many microorganisms cannot be grown in the laboratory, can be identified by these techniques

Keywords: Fish, bioindicator, antimicrobial resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espécimes capturados e utilizados neste estudo. a) Carpa comum; b) Jundiá; c) Acará.....	37
Figura 2. Localização dos pontos de coletas dos peixes deste estudo. Os pontos de coleta estão indicados nas figuras: a) LAPEP; b) Rio Barigui; c) Rio Iraí; d) Rio Pequeno. Imagens do Google Heart.....	38
Figura 3. Espécime de carpa comum em ictiômetro para medição do comprimento total, comprimento padrão e tamanho do intestino.....	39
Figura 4. Abertura ventral de um espécime de jundiá para a coleta do intestino.....	39
Figura 5. Placa de petri com o meio de cultura MacConkey mostrando crescimento bacteriano após 48 h de incubação a 28 °C.....	40
Figura 6. Porcentagem de bactérias isoladas e identificadas por testes bioquímicos para cada peixe ou amostra de água coletada.....	48
Figura 7. Número de cepas bacterianas identificadas bioquimicamente para cada uma das famílias isoladas.....	49
Figura 8. Distribuição das 08 (oito) espécies bacterianas mais abundantes identificadas, no total das amostras, em relação a todos os pontos de coleta, levando em consideração isolados de água e dos peixes.....	50
Figura 9. Perfil eletroforético da amplificação do gene RNAr 16S de bactérias isoladas do intestino de peixes de água doce, em gel de agarose 1,5%.....	52
Figura 10. Famílias bacterianas identificadas por diferentes metodologias. a) famílias bacterianas identificadas com auxílio de kits comerciais; b) famílias bacterianas identificadas pelo sequenciamento do gene 16S RNAr.....	53
Figura 11. Distribuição das espécies bacterianas identificadas pelo sequenciamento do gene RNAr 16S dentre os 320 isolados analisados.....	54
Figura 12. Percentagem de isolados resistentes para cada um dos antibióticos testados, levando em consideração 127 isolados bacterianos identificados por testes bioquímicos.....	54
Figura 13. Frequência de resistência aos antibióticos apresentada pelas	

bactérias identificadas bioquimicamente para cada um dos pontos de coleta amostrados.....	55
Figura 14. Incidência de resistência aos antibióticos levando em consideração as famílias bacterianas isoladas.....	56
Figura 15. Perfil de resistência aos antibióticos de 114 cepas bacterianas isoladas de peixes do LAPEP.....	57
Figura 16. Perfil de resistência aos antibióticos de bactérias isoladas e não identificadas fenotipicamente provenientes dos rios Barigui, Irai e Pequeno.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Componentes da reação de PCR para amplificação do gene RNAr 16S e suas concentrações.....	43
Tabela 2. Bactérias caracterizadas pelos kits de identificação e quantidade por local amostrado.....	51
Tabela 3. Número de isolados para cada um dos índices de MAR obtidos, analisados por pontos de coleta.....	58
Tabela 4. Número de isolados para cada um dos índices de MAR obtidos, analisados por procedência de isolamento.....	58
Tabela 5. Valor de P das análises para a resistência microbiana dos isolados de todos os pontos de coleta, considerando os resultados obtidos para todos os antibióticos conjuntamente.....	59
Tabela 6. Valor de P das análises para a resistência microbiana dos isolados de jundiá.....	59
Tabela 7. Valor de P das análises estatísticas para a resistência microbiana dos isolados de todos os pontos de coleta.....	59
Tabela 8. Valor de P das análises estatísticas para a resistência microbiana dos isolados de jundiá e carpa isolados do LAPEP.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	- Ampicilina
ARGs	- Genes de Resistência a Antibióticos
ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i>
CFL	- Cefalotina
CFO	- Cefoxitina
CLSI	- <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CONAMA	- Conselho Nacional do Meio Ambiente
CP	- Comprimento Padrão
CPM	- Cefepime
CRO	- Ceftriaxona
CT	- Comprimento Total
CTAB	- Brometo de Cetiltrimetilamônio
ddNTP	- Didesoxinucleotídeo trifosfato
DGGE	- Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação
DNA	- Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	- Desoxirribonucleotídeos trifosfato
EDAS	- <i>Electrophoresis Documentation and Analysis Systems</i>
EDTA	- Ácido Etilenodiaminotereacético
ERIC	- <i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus</i>
ETEs	- Estação de Tratamento de Esgoto
ETP	- Ertapenem
GEN	- Gentamicina
IAP	- Instituto Ambiental do Paraná
LAPEP	- Laboratório de Pesquisa e Piscicultura da Pontifícia Universidade Católica do Paraná
MAR	- Índice de múltipla resistência aos antibióticos
MRSA	- <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a meticilina
NAL	- Ácido nalidíxico
NCR	- <i>National Center of Research</i>
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PBS	- Solução Salina Fosfatada
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase

pH	- Potencial Hidrogeniônico
R	- Resistente
RAPD	- <i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i>
RFLP	- <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	- Ácido Ribonucléico
RNAr	- RNA ribossomal
S	- Sensível
SDS	- Dodecil Sulfato de Sódio
SUT	- Sulfametazol/Trimetropim
Taq	- <i>Thermus aquaticus</i> polimerase
TBE	- Tris Borato EDTA
TE	- Tris EDTA
TET	- Tetraciclina
TGI	- Trato gastrintestinal
UFC	- Unidade Formadora de Colônia
WHO	- <i>World Health Organization</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	- centímetro
g	- gramas
Km	- Quilômetros
Km ²	- Quilômetro quadrado
l/s	- Litros por segundo
m	- Metro
M	- Molar
m ²	- Metros quadrado
m ³	- Metros cúbico
mg/l	- Miligramas por litro
mg/mL	- Miligrama por mililitro
mL	- Mililitros
mm	- Milímetro
mM	- Milimolar
NaCl	- Cloreto de Sódio
pb	- Pares de Bases
pmol/μl	- Picomol por microlitro
rpm	- Rotações por Minuto
U	- Unidades
°C	- Graus Celsius
μg	- micrograma
μg/mL	- Micrograma por mililitro
μl	- Microlitros
%	- Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
3 REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1 CARACTERIZAÇÃO BACTERIANA	20
3.1.1 Métodos de identificação bacteriana.....	22
3.1.2 Identificação bacteriana através do gene 16S RNAr.....	24
3.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS	26
3.2.1 Uso indiscriminado dos antibióticos.....	28
3.2.2 Antibióticos no meio ambiente.....	29
3.2.3 Resistência bacteriana em ambientes naturais.....	31
3.2.4 Impacto sobre a saúde pública.....	34
4 METODOLOGIA	37
4.1 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	37
4.1.1 Amostras coletadas.....	37
4.1.2 Localização dos pontos de coleta das amostras.....	37
4.2 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS	39
4.3 IDENTIFICAÇÃO POR TESTES BIOQUÍMICOS	41
4.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS	42
4.4.1 Extração de DNA de colônias isoladas.....	42
4.4.2 Amplificação do gene 16S RNAr.....	43
4.4.3 Sequenciamento dos amplicons.....	44
4.4.4 Análise das sequências.....	45
4.5 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS	45
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5 RESULTADOS	47
5.1 ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E EXTRAÇÃO DO DNA BACTERIANO	47
5.2 AMPLIFICAÇÃO PARCIAL DO GENE 16S RNAr	51
5.3 SEQUENCIAMENTO DO AMPLÍCONS	52

5.4 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS.....	54
6 DISCUSSÃO.....	61
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
REFERÊNCIAS.....	79

1 INTRODUÇÃO

A introdução dos antibióticos no tratamento de enfermidades ocorreu logo após a Segunda Guerra Mundial e tem contribuído drasticamente para a diminuição de mortes causadas por doenças infecciosas. Entretanto, os antibióticos estão perdendo o status de “droga milagrosa” em função do aumento de ocorrência de resistência das bactérias a estes compostos.

O amplo uso de antibióticos na medicina humana e animal, bem como o uso desse fármaco como promotor de crescimento para animais de produção, tem resultado no aumento do número de bactérias comensais e patogênicas resistentes aos antimicrobianos, o que vem se tornando um dos maiores problemas de saúde pública atualmente.

O uso indiscriminado de antibióticos tem levado ao aparecimento de bactérias resistentes no trato digestório de humanos. Tais bactérias, uma vez no ambiente, podem atingir populações de peixes e passar a fazer parte da microbiota desses animais.

Além disso, estudos apontam que em corpos d’água próximos a hospitais, bem como em ambientes de produção aquícola, um maior número de bactérias resistentes a antibióticos é encontrado. Isso se deve ao fato desses compostos não serem completamente metabolizados no organismo de quem deles faz uso. Dados indicam que cerca de 70% de seus compostos são liberados de forma ativa no meio ambiente.

Desde o início dos anos 60 a humanidade tem consciência do potencial de risco e efeitos adversos de produtos químicos, e o seu risco para o ambiente aquático e terrestre em particular. Por algumas razões, tais como, serem encontrados em praticamente todos os ambientes aquáticos e por desempenharem um importante papel ecológico nas teias alimentares aquáticas, os peixes tem atraído considerável atenção em estudos biológicos, e passaram a ser utilizados como biomarcadores.

A associação entre a ocorrência de resistência a antibióticos em bactérias isoladas de intestino de peixes coletados em locais com diferentes níveis de ação antrópica deve permitir a utilização do perfil dessas populações como um bioindicador.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi estudar o perfil das espécies bacterianas do trato digestório de peixes de água doce e o nível de ocorrência de resistência aos antibióticos desses microrganismos, utilizando-se animais provenientes de áreas com diferentes níveis de ação antrópica.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar as espécies bacterianas do trato digestório de jundiá, carpa comum e acará, de diferentes procedências;
- Avaliar o perfil microbiano do intestino de peixes em comparação com a água de cultivo;
- Avaliar a eficácia de técnicas fenotípicas de identificação bacteriana quando comparadas com técnicas moleculares, particularmente com o sequenciamento do gene de RNA ribossomal 16S (RNAr 16S);
- Avaliar o perfil de resistência a antibióticos dessas bactérias;
- Associar a ocorrência de resistência a antibióticos em bactérias com o nível de ação antrópica dos pontos onde estas bactérias foram isoladas para utilizar como bioindicador da utilização de antibióticos pela população desta região.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CARACTERIZAÇÃO BACTERIANA

A diversidade microbiana existe, em diferentes níveis, dentro de espécies, comunidades e ecossistemas. Entretanto, até poucas décadas, a compreensão desta diversidade era limitada devido à pequena quantidade de espécies de microrganismos passíveis de cultivo, representando menos de 1% do total dos existentes no planeta (YANG, YAO & WANG, 2004).

O trato gastrintestinal (TGI) de um animal consiste de um ecossistema microbiano muito complexo e dinâmico que é muito importante para a nutrição, fisiologia e patologia do hospedeiro (RASTALL, 2004).

A primeira observação sobre a ocorrência de microrganismos gastrintestinais em um hospedeiro animal foi feita por Lewenhock em 1674 (DOBELL, 1932). Entretanto, um estudo abrangente de bactérias intestinais foi iniciado após a descoberta de *Escherichia* no trato gastrintestinal de humanos, abrindo as portas para o estudo da microbiota gastrintestinal em outras espécies (NAYAK, 2010).

Nos últimos 20 anos, a distribuição e ocorrência da microbiota gastrintestinal têm sido muito estudada com distintas finalidades em diferentes espécies animais (NAYAK, 2010), e, com o auxílio da evolução de ferramentas moleculares e de biotecnologia, este complexo ecossistema está começando a ser desvendado em muitas espécies (RASTALL, 2004).

Entretanto, de acordo com Nayak (2010), até os anos de 1970 não existia um relatório concreto sobre a existência de uma microbiota indígena estável em animais aquáticos, porém, nas últimas décadas pesquisas substanciais foram realizadas para caracterizar a microbiota gastrintestinal em diversas espécies de peixes. Mas, apesar de a presença dessa microbiota ser reconhecida, pouco se sabe sobre o estabelecimento, a diversidade e a importância dessas comunidades bacterianas na nutrição e na saúde dos peixes.

A colonização microbiana, seu estabelecimento, composição e diversidade no trato gastrintestinal de peixes é um processo complexo e, acredita-se ser um reflexo da composição microbiana da água de criação, da

dieta e do ambiente onde o animal vive (RINGØ et al., 2006; FJELLHEIM et al., 2007).

A população microbiana do TGI pode variar entre diferentes hospedeiros, porém normalmente apresentam os mesmo representantes encontrados no habitat e na dieta do hospedeiro. Alterações na composição da população microbiana não afeta significativamente na contagem total de bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas, porém, a distribuição de espécies pode ser alterada. A população microbiana tem grande influência no organismo do animal, sendo as suas principais funções: a contribuição nutricional, resistência à colonização por microrganismos patogênicos e imunomodulação dos hospedeiros (MACFARLAND, 2000).

A microbiota de peixes consiste, principalmente, de microrganismos aeróbicos e anaeróbios facultativos, bem como de anaeróbios obrigatórios, especialmente *Cetobacterium somerae*, *Bacteroidaceae*, e *Clostridium* (CAHILL, 1990).

A predominância de anaeróbios no TGI de peixes foi bem descrito nas espécies de kingio (*Carassius auratus*), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (SAKATA, OKABAYASHI & KAKIMOTO, 1980; SUGITA et al., 1989; SPANGGAARD et al., 2000). Já outros estudos demonstraram igual número de bactérias anaeróbias (*Bacteroides* e *Fusobacterium*) e bactérias aeróbias (*Aeromonas* e *Pseudomonas*) no TGI de carpa capim (WU et al, 2012).

Estudos mostram ainda que, em peixes de água doce, *Aeromonas*, *Pseudomonas* e *Bacteroides* são os maiores colonizadores do TGI, seguidos de *Pleisiomonas*, *Enterobacteriaceae*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Clostridium*, e espécies de *Fusarium* (TRUST et al., 1979). Em contraste, peixes marinhos são colonizados predominantemente por espécies de *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Corynebacterium*, *Alteromonas*, *Flavobacterium* e *Micrococcus* (CAHILL, 1990; VERNER-JEFFREYS et al., 2003).

Austin (2002), em uma revisão sobre a microbiota bacteriana de peixes, considera que existe um grande número de táxons associados ao trato digestivo de peixes de água doce, tais como *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Eikenella*,

Bacteroides, *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei*, *Cytophaga*, *Flexibacter*, *Bacillus*, *Listeria*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus*, *Moraxella* e *Pseudomonas*.

Estudos como o de Hovda e colaboradores (2007), Kim e colaboradores (2007) e Navarrete e colaboradores (2010) demonstraram que bactérias gram negativas como *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Bacteroides*, *Citrobacter*, *Flavobacterium* e *Pseudomonas* são as mais comumente encontradas no intestino de peixes de ambiente de criação.

Molinari e colaboradores (2003), em um estudo sobre a microbiota intestinal da tilápia do Nilo enumeram as bactérias *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii*, *Burkholderia cepacia*, *Chromobacterium violaceum*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Flavimonas oryzihabitans* e *Plesiomonas shigelloides* como sendo as mais frequentemente encontradas no intestino e no estômago desse peixe.

3.1.1 Métodos de identificação bacteriana

Acredita-se que apenas 0,001 a 0,1% dos microrganismos que ocorrem naturalmente no meio ambiente podem ser cultivadas em laboratório. O número de bactérias ambientais conhecidas e cultiváveis soma apenas 5-10% do número total que é estimado estar presente em águas residuais e em plantas de tratamento de água (HIRAISHI, 1998). De acordo com Zellers (1996), quando se tratando de solo, apenas 1% das bactérias presentes podem ser cultivadas e identificadas por métodos microbiológicos clássicos. Dessa forma, a expectativa quanto a espécies com novas funções ou novos produtos ainda é grande (CRUZ, 2001).

Nas últimas décadas, novas técnicas foram desenvolvidas para melhorar esse cenário. Métodos dependentes de biomarcadores, como a quimiotaxonomia, ou métodos genéticos são amplamente utilizados (KÜMMERER, 2004).

A classificação de organismos tem sido baseada tradicionalmente em similaridades morfológicas, de desenvolvimento e características nutricionais. Porém, a identificação baseada apenas nesses critérios não é a mais

adequada, pois nota-se que microrganismos podem ser, nesses aspectos, muito semelhantes uns dos outros e diferirem muito em questões filogenéticas. Portanto, uma aplicação mais abrangente para a descrição de microrganismos, como a utilização de métodos moleculares, se torna desejável (LANE et al., 1985).

Além disso, de acordo com Nayak (2010), estudos mais antigos sobre a composição do trato intestinal (TI) de peixes apresentam resultados não confiáveis, pois a maioria deles foi realizada a partir de homogêneos de conteúdo intestinal e/ou fecal, utilizando métodos fenotípicos de identificação a partir de meios de cultura seletivos ou não, seguido de identificação pelas características morfológicas e bioquímicas. Esses métodos são demorados, além de não terem muita precisão e sensibilidade. Portanto, estes resultados frequentemente levam a um quadro incerto da composição da microbiota total do TGI de peixes, pois acabam selecionando algumas espécies e não possuem a capacidade de identificar microrganismos anaeróbios ou que não tenham a capacidade de crescer em meios de cultura, por exemplo.

Nos dias atuais, técnicas moleculares estão sendo utilizadas para o estudo destes sistemas complexos, isoladamente ou em conjunto com técnicas convencionais, para caracterizar tanto a microbiota cultivável como a não-cultivável no TGI de peixes (HUBER et al., 2004; LIU et al., 2008).

Os métodos genotípicos de taxonomia, direcionados para moléculas de DNA ou RNA, são uma consequência do progresso tecnológico experimentado pela biologia molecular e atualmente dominam os estudos taxonômicos (VANDAMME et al., 1996). Muitas das técnicas moleculares utilizadas atualmente para tipagem contam com a separação eletroforética de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos (OLIVE & BEAN, 1999).

A análise de genomas completos por padrão de bandas do DNA tem sido facilitada pela descoberta de elementos repetitivos, incluindo DNAs polimórficos amplificados aleatoriamente (RAPD), consenso intergênico repetitivo de enterobactérias (ERIC), análise de sítios de enzimas de restrição (RFLP), entre outros (GURTLER & MAYALL, 2001). A eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE) de amplicons de DNA ribossomal 16S, tem sido utilizada para caracterizar ecossistemas complexos. Segundo essa técnica, o DNA total do habitat de interesse é extraído e uma região

hipervariada do RNA ribossomal (RNAr) 16S é amplificada pela reação em cadeia da polimerase (PEDROSO, 2005).

Todas estas técnicas reconhecem sítios aleatórios no genoma que não podem ser previstos sem o sequenciamento total do genoma. Estas técnicas normalmente utilizam a reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar os fragmentos em análise e o resultado é apresentado na forma de um padrão de bandas em um gel eletroforético.

3.1.2 Identificação bacteriana através do gene RNAr 16S

O desenvolvimento de métodos moleculares independentes de cultivo tem facilitado a determinação da diversidade bacteriana, uma vez que fornecem uma perspectiva mais real da complexidade dentro de sistemas ambientais.

O uso das sequências da subunidade menor (16S) de ácido ribonucléico ribossomal (RNAr) para a identificação e taxonomia de microrganismos veio revolucionar os estudos nessas áreas. Essa sequência está universalmente presente em bactérias e archeas, uma vez que codifica o RNAr da subunidade menor do ribossomo desses microrganismos e é utilizada em estudos de diversidade pela característica de estabilidade e por sofrer pouca influência de transferências horizontais (PISA, 2006). O gene RNAr 16S possui aproximadamente 1600 nucleotídeos e gera grande quantidade de informações úteis para inferências filogenéticas (YOUNG, 1992).

Os resultados obtidos com técnicas moleculares como o gene RNAr 16S têm a vantagem de serem independentes das condições de crescimento e meio de cultura utilizados. Em termos evolucionários, mutações no gene de RNAr 16S se acumularam em taxas lentas mas constantes através de milhões de anos (WOESE, 1987), e essas mutações são geralmente localizadas em regiões divergentes bem definidas, chamadas de regiões variáveis e hipervariáveis. Esse padrão de conservação/variabilidade das sequências é explorado para se determinar a identidade de um microrganismo de uma amostra qualquer e pode também levar à identificação de microrganismos

jamais antes identificados. Pelo sequenciamento das regiões variáveis e hipervariáveis do gene de RNAr 16S e comparação das sequências obtidas com o banco de dados de sequências conhecidas de 16S, a identificação de um microrganismo pode ser obtida de maneira rápida e precisa.

Além disso, de acordo com Olsen (1986) e Woese (1987), as principais características que tornam a sequência do RNAr um excelente marcador filogenético são: a) moléculas universais, ocorrendo em todos os organismos, e diferentes posições em sua sequência evoluem a diferentes taxas, permitindo medir relações filogenéticas em quase todos os níveis, entre organismos próximos e distantes; b) são elementos chave da maquinaria da síntese de proteínas e são funcional e evolutivamente homólogos em todos os organismos; c) são moléculas anciãs e extremamente conservadas em toda a sua estrutura; d) as sequências de nucleotídeos também são conservadas. Alguns são conservados entre organismos evolutivamente distantes, enquanto outros variam. As sequências e os elementos de estrutura secundária conservados permitem o alinhamento de sequências variáveis, permitindo que somente nucleotídeos homólogos sejam empregados em análises filogenéticas; e) fornecem informação de sequência suficiente para permitir comparações estatísticas significativas; f) aparentemente os genes para os rRNAs não sofrem interferência de transferências laterais ou horizontais.

A estas características intrínsecas à molécula, pode-se acrescentar ainda o fato da rápida expansão dos bancos de dados que é da ordem de milhares de sequências e engloba representativamente os diversos ramos taxonômicos dos microrganismos. Outra vantagem para a utilização de informações sobre as sequências de RNAr é a sua disponibilização em bases de dados (RDP, Gen-Bank, EMBL), na maioria dos casos, gratuitamente, permitindo a comparação de novas sequências obtidas com as presentes nessas bases de dados (JUNIOR et al, 2002)..

Portanto, nota-se que a informação genotípica é mais acessível e confiável, precisamente interpretada e mais informativa de relações evolucionárias. Os elementos de uma sequência de nucleotídeos ou aminoácidos são restritos em números e bem definidos (quantificados) substituindo julgamentos subjetivos por julgamentos mais objetivos.

Atualmente, novos marcadores estão sendo propostos como alternativa ao gene RNAr 16S, entretanto, desde o início dos trabalhos de Woese e colaboradores com esse gene até os dias atuais, as informações sobre esta molécula, principalmente sua sequência, tem-se acumulado dramaticamente. Isso se deve, em parte, ao desenvolvimento de métodos rápidos e simples para o sequenciamento do rRNA usando transcriptase reversa (LANE et al., 1985) e mais tarde, o uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação e sequenciamento seletivo dos genes que codificam para os rRNAs, principalmente o 16S (MEDLIN et al., 1988; BOTTGER, 1989; EMBLEY, 1991).

Como consequência, mesmo os marcadores que teoricamente contém maior quantidade de informações filogenéticas ainda levarão certo tempo para atingirem um volume de informação que permitira usá-los em preferência ao 16S, já que cada vez mais créditos são depositados nesta molécula para exercer este papel (LUDWIG & SCHLEIFER, 1999).

3.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos são produtos químicos de origem natural ou artificial e podem ser divididos em diferentes classes de acordo com os mecanismos de ação, tais como quinolonas, tetraciclina, macrolídeos, sulfonamidas e β -lactâmicos. É um agente quimioterapêutico que inibe ou suprime o crescimento de microrganismos, tais como bactérias, fungos ou protozoários (KÜMMERER, 2009).

A introdução dos antibióticos logo depois da Segunda Guerra Mundial resultou numa diminuição drástica do número de mortes devido a infecções bacterianas. Entretanto, atualmente os antibióticos têm perdido o seu status de “drogas milagrosas”, em função do crescente aumento da resistência bacteriana a antibióticos (BUD, 2007; SCHJØRRING & KROGFELT, 2011).

Com a descoberta das penicilinas e sua utilização no tratamento de infecções, acreditou-se que as doenças infecciosas deixariam de ser um problema na prática médica. Porém, pouco tempo após o início da sua utilização, em 1946, cerca de 5% das cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de pacientes eram resistentes à penicilina. Em 1949 este número

subiu para 29% das cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de hospitais, e em 1950 cerca de 80% já eram classificadas como resistentes em hospitais americanos (BAUER, PERRY & KIRBY, 1960).

A resistência bacteriana aos antibióticos pode ser tanto natural quanto adquirida. No caso de resistência natural ou intrínseca, a bactéria é resistente a uma determinada classe de antibióticos, pois conta com uma estrutura genética desprovida do alvo de ação ou do sistema de transporte para uma determinada classe de antimicrobianos. Já a resistência adquirida pode ocorrer tanto como resultado de uma mutação no DNA do genoma do microrganismo, ou pelo intercâmbio genético entre estirpes em que elementos do DNA como plasmídeos, transposons, integrons, que desenvolvam resistência são transferidos entre os microrganismos (TAVARES, 2006).

Os antibióticos agem como indutores para a expressão de genes bacterianos que codificam mecanismos de resistência às drogas (BUTAYE et al., 2003). Assim, na presença de genes de resistência, a seleção de uma população de microrganismos resistentes pode ser uma consequência de pressão de seleção devido ao uso de antibióticos. O poder de seleção é proporcional ao tempo de exposição das bactérias aos antibióticos (ALLI ABADI & LESS, 2000).

O fato desses organismos serem capazes de causar infecções graves e poderem adquirir resistência a antimicrobianos torna as opções de tratamento limitadas. Além disso, este aumento na prevalência de patógenos resistentes às drogas está ocorrendo num momento em que a descoberta e o desenvolvimento de novos agentes anti-infecciosos está diminuindo (SPELLBERG, 2008).

A ampla utilização de antibióticos na medicina humana e animal, bem como na produção animal, tem resultado no aumento do número de bactérias comensais e patogênicas resistentes a agentes antimicrobianos, o que vem se tornando um dos principais problemas de saúde pública (SØRUM & ABÉE-LUND, 2002; RIVERA-TAPIA, 2003).

Mecanismos de sobrevivência bacteriana a antibióticos incluem a aquisição de genes de resistência a antibióticos de outras bactérias ou de fagos (transferência horizontal de genes ou transdução), mutações em genes específicos, e alteração da superfície bacteriana. Assim, o uso contínuo e o

acúmulo de antibióticos no meio ambiente tem resultado no aumento de bactérias resistentes aos antibióticos, não só na Europa, mas também em nível mundial (SCHJØRRING & KROGFELT, 2011).

3.2.1 Uso indiscriminado dos antibióticos

O consumo de antibióticos per capita, bem como os tipos de antibióticos utilizados varia entre os países. Taxas de prescrição, bem como o consumo sem receita também variam conforme a localidade (MÖLSTAD et al., 2002).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 50% de todos os antimicrobianos produzidos nos Estados Unidos são administrados em animais, sendo a maior parte utilizado para usos subterapêuticos (WHO, 2001). O consumo anual de antibióticos, a nível global, tem sido estimado, entre 100.000 a 200.000 toneladas (KÜMMERER, 2003).

Simões e Farache (1988), ao analisar o consumo de medicamentos no estado de São Paulo observaram que 12% dos medicamentos consumidos resultaram de uma prescrição médica anterior. O farmacêutico e/ou balconista de farmácia contribuiu com 10%; a automedicação atribuída à orientação de pessoas do seu relacionamento contribuiu com 9,1% e à própria escolha com 10,7%. Berquo et al., (2004), entrevistaram 6.145 indivíduos de todas as idades residentes na zona urbana de Pelotas, Rio Grande do Sul e observaram que as drogas antimicrobianas mais utilizadas foram as penicilinas (41%), as sulfas (17%) e as tetraciclina (8%). Já em hospitais brasileiros (de até 300 leitos), prestadores de serviços para o Sistema Único de Saúde, dados do Ministério da Saúde sobre o uso de antimicrobianos, mostram as cefalosporinas como o grupo de antimicrobianos mais prescritos (31,1%), seguido por penicilinas (25,4%), aminoglicosídeos (18,5%), cloranfenicol (6,9%), sulfonamidas (4,8%), metronidazol (3%), quinolonas (2,6%) e glicopeptídeos (2%) (DEPIZZOL, 2006).

O uso de antibióticos pelos pacientes parece ser influenciado pela escolha da prescrição, pelo sistema de saúde, pela economia, pelo nível de

conhecimento, pelo comportamento do paciente e pelas expectativas do médico e do paciente (McNULTY & FRANCIS, 2010).

Em um artigo publicado na Inglaterra, em 1998, os autores mostram dados relativos ao uso de antibióticos no mundo. Este artigo demonstra que, de todas as drogas utilizadas, 50% se destinam a uso humano e 50% ao agroveterinário. Da fração de drogas usada em humanos, 20% são em hospitais e 80% pela comunidade. Desse montante, calcula-se que de 20% a 50% não haja necessidade de uso. Para o uso veterinário, os dados são mais alarmantes, pois cerca de 20% são usados terapêuticamente e até 80% para uso profilático e promoção de crescimento (WISE et al., 1998).

Em estudo sobre a prevalência de automedicação na Europa concluiu-se que esta prática é maior na Europa Oriental e do Sul que no Norte e Europa Ocidental. Da mesma forma, os países do Norte bem como a Holanda apresentam a menor frequência de consumo de antibióticos e o menor nível de bactérias resistentes (GOOSSENS et al., 2005; GRIGORYAN et al., 2006).

De acordo com Kümmerer (2003) o uso de antibióticos pela população em geral relatado no Reino Unido é de 95%, nos Estados Unidos de 75%. Na Alemanha aproximadamente 75% do total são utilizados pela comunidade e apenas 25% nos hospitais.

Em alguns países em desenvolvimento, os antibióticos podem ser adquiridos em doses únicas, o que aumenta o risco do tratamento ser encerrado antes do sucesso clínico. Em outros, os antibióticos podem ser comprados sem a prescrição, o que contribuirá também para a taxa de automedicação e tratamentos incompletos (SCHJØRRING & KROGFELT, 2011).

3.2.2 Antibióticos no meio ambiente

Acredita-se que 70% dos antibióticos utilizados são liberados sem serem metabolizados no organismo do paciente, principalmente em ambientes aquáticos através do esgoto. Além disso, medicamentos não utilizados também são rotineiramente descartados no esgoto. Consequentemente, os efluentes hospitalares são comprovadamente compostos por resíduos de antibióticos,

além desses resíduos também já terem sido detectados em esgotos domésticos (KÜMMERER, 2004).

É sabido que antibióticos em concentrações sub-inibidoras podem ter um impacto sobre as funções celulares e alterar a expressão genética de fatores de virulência ou a transferência da resistência aos antibióticos (SALYERS et al., 1995; OHLSEN et al., 1998).

Do total de 412 toneladas de antibióticos utilizadas na Alemanha em 1998, levando em conta a taxa de metabolização descrita acima, calcula-se que 305 toneladas foram emitidas para as águas residuais, excretadas inalteradamente no ambiente, ou seja, na forma de compostos ainda ativos dos quais 92 toneladas foram provenientes de hospitais (KÜMMERER & HENNINGER, 2003; KÜMMERER, 2009).

Freqüências elevadas de resistência aos antibióticos têm sido relatadas em bactérias isoladas de áreas onde os antibióticos foram amplamente utilizados pelos seres humanos, bem como ambientes terrestres e aquáticos sujeitos a criação intensiva de animais (LEE et al., 1993; DePAOLA et al., 1995).

O antibiótico ciprofloxacina foi encontrado em concentrações entre 0,7 mg/L e 124,5 mg/L em efluentes hospitalares (HARTMANN et al., 1999). A ampicilina foi encontrada em concentrações entre 20 e 80 mg/L no efluente de um grande hospital alemão (KÜMMERER, 2001). As concentrações de antibióticos medidas nos efluentes do hospital são da mesma ordem de grandeza da concentração inibitória mínima de bactérias patogênicas sensíveis (KÜMMERER & HENNINGER, 2003).

A diluição de efluentes do esgoto hospitalar diminuirá a concentração de antibióticos apenas moderadamente, pois águas residuais municipais não hospitalares também contêm substâncias antibióticas e desinfetantes. Estudos realizados na Alemanha e nos Estados Unidos revelam a presença de 15 diferentes tipos de antibióticos em excesso em córregos que recebem efluentes urbanos e industriais e/ou escoamento das práticas agrícolas (TERNES et al., 2002; KOLPIN et al., 2001). Entretanto, é provável que essa diversidade seja ainda maior considerando-se que muitos antibióticos não foram investigados e que os métodos de preparação da amostra, extração e análise ainda estão em desenvolvimento (COSTANZO; MURBY; BATES, 2005).

Antibióticos têm sido detectados na faixa de mg/L em esgotos municipais, no efluente de estações de tratamento de esgoto (ETEs), em águas de superfície e em solos (ZUCCATO et al., 2000; KOLPIN et al., 2001). O trabalho de revisão de Kümmerer (2003), lista como as quinolonas, a ciprofloxacina, as sulfonamidas, a eritromicina, entre outros, como os mais encontrados.

Portanto, estudos indicam que a biodegradação de antibióticos em estações de tratamento de esgoto e outros compartimentos ambientais não pode ser uma opção para a remoção confiável de substâncias antibióticas.

3.2.3 Resistência bacteriana em ambientes naturais

Devido ao fato de os antibióticos serem amplamente utilizados na terapêutica humana e animal, como promotores de crescimento para os animais, e também pelo fato de que a maioria desses antibióticos é excretada inalteradamente no ambiente, a preocupação sobre o potencial impacto desses resíduos tem aumentado. Portanto, a principal fonte de antibióticos no meio ambiente tem influência antrópica, a partir da descarga do esgoto no ambiente, pelo uso de fezes de animais como fertilizantes e também pela prática da aquicultura (KÜMMERER, 2009), como é demonstrado no trabalho de Yang e Carlson (2003), que fazem uma correlação positiva entre as atividades humanas e a presença de antibióticos em ambientes naturais.

Além disso, em águas de superfície é difícil encontrar uma área onde os antibióticos não podem ser detectados, exceto em locais sem qualquer ação antrópica, como rios e córregos de regiões montanhosas, antes de atravessarem áreas urbanas e agrícolas (YANG & CARLSON, 2003). Alguns antibióticos podem ser encontrados até mesmo em águas subterrâneas com mais de 10 metros de profundidade (BATT et al., 2006).

Além da poluição química causada por esses produtos, o uso destes também pode acelerar o desenvolvimento de genes de resistência a antibióticos (ARGs) em bactérias com potencial risco para a saúde dos seres humanos e animais (KEMPER 2008). Estas bactérias podem ser transmitidas a

partir do ambiente para humanos através do contato direto ou indireto (IVERSEN et al., 2004, KIM et al., 2005; RODRÍGUEZ et al., 2006).

De acordo com Baquero e colaboradores (2008) bactérias patogênicas e potencialmente patogênicas são constantemente liberadas no meio aquático através de diferentes fontes. Muitos desses microrganismos são portadores de genes de resistência, que podem ser integrados em plasmídeos ou transposons e trocados com bactérias naturais do ambiente.

O aumento da ocorrência de resistência antimicrobiana em bactérias provenientes de ambientes de produção animal e as possíveis implicações para saúde pública têm levado a uma intensiva fiscalização do uso de antimicrobianos em alguns países (LIMA et al., 2006). O ambiente aquícola é importante meio para a seleção de espécies bacterianas resistentes a vários antimicrobianos, em virtude da sua utilização no tratamento e profilaxia de doenças bacterianas, muitas vezes de forma indiscriminada.

O uso de uma ampla variedade de antibióticos em larga escala, incluindo antibióticos não-biodegradáveis úteis na medicina humana, exerce uma pressão seletiva no ambiente aquático, pois permanece nesse ambiente por longos períodos. Este processo resulta no aparecimento de bactérias resistentes aos antibióticos no ambiente aquático, com o aumento da resistência em patógenos de peixes, bem como na transferência de determinantes de resistência para bactérias do solo e patógenos humanos e animais, e em alterações na flora bacteriana tanto dos sedimentos como da coluna de água (CABELLO, 2006).

Há um grande número de estudos que indicam que a microbiota bacteriana em locais circundantes a ambientes utilizados na produção aquícola contém um maior número de bactérias resistentes aos antibióticos. Os determinantes de resistência aos antibióticos que emergem e são selecionados nos ambientes aquáticos podem ser transmitidos por transferência horizontal de genes às bactérias do ambiente terrestre, incluindo patógenos humanos e animais (HEUER et al., 2009)

A transferência genética de resistência ocorre frequentemente no trato gastrointestinal de humanos e animais que contém, muitas vezes, bactérias sob pressão seletiva devido à exposição contínua a níveis terapêuticos ou sub-terapêuticos de antimicrobianos (LIMA et al., 2006; SANTOS, 2009).

A transferência da resistência de bactérias encontradas no ambiente para as bactérias dos seres humanos pode ocorrer através do contato direto com os organismos aquáticos, através da água potável ou através da manipulação e/ou consumo de produtos aquícolas (HEINITZ et al., 2000).

A transferência horizontal de genes de resistência a antibióticos no trato digestivo foi inicialmente comprovada em humanos, envolvendo resistência à tetraciclina em *Bacteroides* spp. (SHOEMAKER et al., 2001). Os autores compararam a incidência de gene de resistência em isolados de *Bacteroides* coletados e mantidos em bancos desde antes de 1980, com isolados coletados nos anos 1990. O aumento da ocorrência do gene de resistência saltou de 23% em amostras dos anos 70, para mais de 80% nas amostras dos anos 90. Tais resultados suportam a hipótese de que elevada transferência de genes ocorre entre bactérias do cólon humano, tanto dentro do gênero *Bacteroides* quanto entre estes e outras bactérias gram-negativas.

Wiggins et al. (1999) utilizaram a resistência a antibiótico para identificar fontes não pontuais de poluição fecal ao analisarem isolados de estreptococos fecais de criações de bovinos leiteiros, bovinos de corte, frangos, perus, esgoto doméstico e de cursos d'água supostamente não contaminados. Foi possível correlacionar o padrão de resistência dos isolados com a classificação da fonte de poluição fecal com coeficientes entre 96 e 100%.

Koike et al. (2007), realizaram com sucesso a monitoração e rastreamento das fontes de gene de resistência ao antibiótico tetraciclina a partir de lagoas de estabilização de criação de suínos e água de lençol freático adjacente. Análise comparativa da seqüência do gene *tetW* revelou que o gene presente nas águas de lençol freático sob impacto das lagoas possuía 99,8% de identidade com aquele encontrada nas lagoas.

Giraud et al. (2006), estudando lago de aquicultura marinha contendo peixe robalo (*Dicentrarchus labrax*), ostras (*Crassostrea gigas*) e mexilhões de Manila (*Ruditapes philippinarum*), e utilizando dieta do robalo contendo o antibiótico ácido oxolínico, um quinolônico de primeira geração, monitorou o aumento da resistência ao antibiótico por *Vibrio* spp. Os resultados mostraram que seleção no sentido de aumentar a resistência ao ácido oxolínico foi observada no intestino do peixe, mas não nos bivalves ou no sedimento do lago.

O emergente crescimento de ARGs no ambiente aquático está se tornando uma preocupação em todo o mundo. De acordo com Zhang et al. (2009), em uma revisão que compila publicações recentes de informações sobre tipos, distribuição e transferência horizontal de ARGs em diversos ambientes aquáticos, demonstra que centenas de ARGs que codificam a resistência a uma ampla gama de antibióticos foram encontrados em microrganismos distribuídos não só em efluentes hospitalares e efluentes da produção animal, mas também na de esgoto, tratamento de águas residuais, em água de superfície, água subterrânea, e até mesmo em água potável.

3.2.4 Impacto sobre a saúde pública

A resistência a antibióticos entre as bactérias tornou-se uma ameaça à saúde pública mundial. Apesar das intervenções com objetivo de prevenir o surgimento e propagação de bactérias resistentes a antimicrobianos, as taxas continuam a subir rapidamente. A disseminação generalizada de genes de resistência aos antibióticos é resultado da má administração e do uso excessivo de antibióticos, combinados com a capacidade bacteriana de transferir genes de resistência através de plasmídeos e transposons, bem como a presença destes microrganismos em locais com grande potencial de exposição a antibióticos, tais como hospitais (SMETS & BARKAY, 2005)

Agências reguladoras podem definir orientações e medidas para uso de antibióticos de forma adequada. Por exemplo, alguns países perceberam que as propagandas contra o uso inadequado de antibióticos em campanhas nacionais podem reduzir a quantidade total utilizada, devido à sensibilização e informação adequada do público (GOOSSENS et al., 2006)

O impacto econômico da resistência bacteriana aos antimicrobianos também é relevante. Infecções causadas por bactérias resistentes estão associadas com taxas de mortalidade mais elevadas, maior tempo de permanência nos hospitais e maiores custos hospitalares, quando comparadas com as infecções causadas por bactérias mais sensíveis aos antibióticos (SHALES et al., 1997).

Nas últimas décadas, vários agentes patogênicos resistentes a antimicrobianos foram identificados como causa de infecções graves em pacientes hospitalizados. Esses organismos são tipicamente resistentes a múltiplas classes de agentes antimicrobianos, e, por isso, chamados de multiresistentes. De fato, algumas cepas se tornaram resistentes a praticamente todos os agentes antimicrobianos comumente disponíveis. Um caso notório é o *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), que é resistente não apenas a esta classe de antibióticos, mas geralmente também aos aminoglicosídeos, macrolídeos, tetraciclina, cloranfenicol e lincosamidas (AMORIM et al., 2009).

Em 1998, nos Estados Unidos foi estimado que o gasto anual em hospitais devido a problemas com a resistência da bactéria *Staphylococcus aureus* foi de 122 milhões dólares, enquanto a com infecções hospitalares foi de 4,5 bilhões dólares (INSTITUTE OF MEDICINE, 1998). Um levantamento mostrou que houve 18.650 mortes de pacientes contaminados com *S. aureus* resistentes à meticilina nos Estados Unidos em 2005, ultrapassando o número total de mortes devido ao HIV/AIDS no mesmo ano (CASSEL & MEKALANOS, 2001; KLEVENS et al., 2007). Além disso, estima-se que mais de 70% das bactérias encontradas em ambientes hospitalares nos Estados Unidos sejam resistentes a pelo menos um antibiótico (MURTHY, 2001).

A resistência das bactérias aos antimicrobianos de primeira escolha tem aumentado consideravelmente. São exemplos *Klebsiella* spp. e *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases de espectro estendido ou que apresentam resistência as cefalosporinas de terceira geração; *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina; *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina; *Acinetobacter* spp. sensível somente à carbapenêmicos (HARBARTH, 2001; SEGAL-MAURER et al., 1996); *Pseudomonas* spp. resistentes à aminoglicosídeos, carbapenêmicos ou cefalosporinas (HARBARTH, 2001); e *Enterobacter* spp. resistentes à β -lactamases de espectro estendido (CONLY, 2002).

Entretanto, a prevalência de microrganismos multirresistentes varia de acordo com o local de estudo, com taxas entre 58% e 71% de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a ciprofloxacina, 43% a 59% de *Staphylococcus aureus*

meticilina resistentes e de 7% a 63% das amostras de *Escherichia coli* resistentes a gentamicina (WATTAL et al., 2005; AUBERT, 2005).

Sendo assim, o uso prudente de antibióticos em todas as áreas parece ser a chave para enfrentar com êxito a resistência no meio ambiente. A utilização racional de antibióticos e desinfetantes na saúde animal e humana e na agricultura deverá reduzir significativamente o risco para o público em geral e para o meio ambiente (KÜMMERER, 2004).

4 METODOLOGIA

4.1 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

4.1.1 Amostras coletadas

As espécies de peixes utilizadas neste estudo foram o jundiá (*Rhamdia sp.*), a carpa comum (*Cyprinus carpio*) e o acará (*Geophagus brasiliensis*). O jundiá e a carpa são amplamente utilizados na piscicultura, sendo o jundiá e o acará peixes de ocorrência frequente nos rios da região estudada (Figura 1).

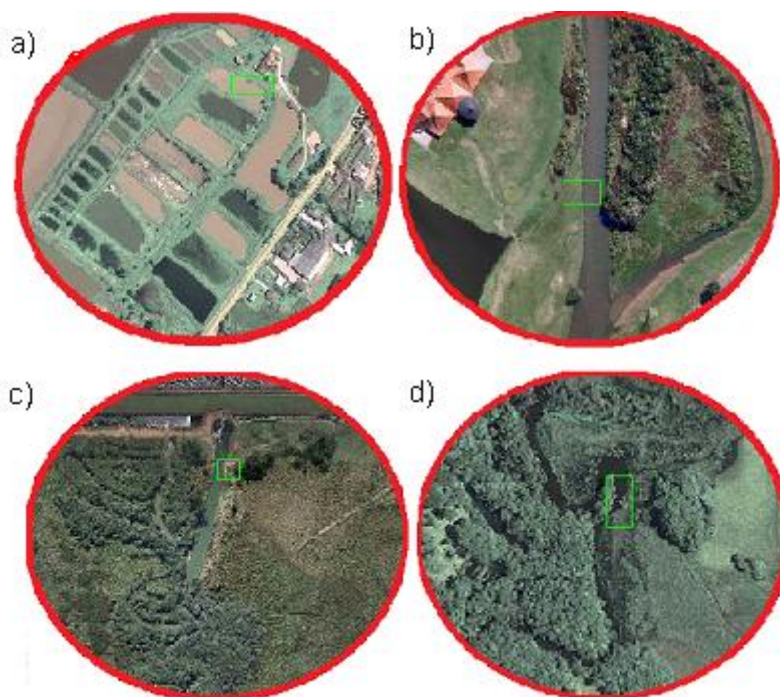
Figura 1. Espécimes capturados e utilizados neste estudo. a) Carpa comum; b) Jundiá; c) Acará.



4.1.2 Localização dos pontos de coleta das amostras

Os animais foram capturados em quatro locais (Figura 2): Laboratório de Pesquisa e Piscicultura da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (LAPEP/PUCPR) ($25^{\circ}34'55''\text{S}$ e $49^{\circ}13'19''\text{W}$), sendo este considerado como local de produção intensiva, e em mais três locais com diferentes níveis de ação antrópica, pertencentes à bacia hidrográfica do Rio Iguaçu, tais como o Rio Barigui ($25^{\circ}25'33.99''\text{S}$ e $49^{\circ}18'27.00''\text{W}$) e Irai ($25^{\circ}26'35.00''\text{S}$ e $49^{\circ}03'37.00''\text{W}$), considerados locais com elevado grau de adensamento populacional e ação antrópica, e Rio Pequeno ($25^{\circ}25'33.99''\text{S}$ e $49^{\circ}12'29.99''\text{W}$) como ponto com pouco adensamento populacional e baixa ação antrópica.

Figura 2. Localização dos pontos de coletas dos peixes deste estudo. Os pontos de coleta estão indicados nas figuras: a) LAPEP; b) Rio Barigui; c) Rio Iraí; d) Rio Pequeno. Fonte: Google Earth, 2011.



Os animais foram capturados com o auxílio de rede de arrasto ou anzóis, sacrificados por eutanásia utilizando superdosagem do anestésico benzocaína 10% que foi adicionado a água (etil-aminobenzoato), em seguida colocados em caixa térmica contendo gelo e, imediatamente transportados ao Laboratório de Biologia Molecular Aplicada à Agropecuária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, onde foram realizadas as análises laboratoriais. Além disso, amostras de água de todos os pontos foram coletadas para análises microbiológicas, nas 9 coletas realizadas.

Para a realização da coleta de amostras de água, foram utilizados frascos de vidro de 100 mL estéreis. Foram coletados 100 mL de água numa profundidade de aproximadamente 15 cm da superfície dos tanques e dos rios e, em seguida, o frasco foi tampado, armazenado em caixa térmica com gelo e transportado até o laboratório, onde foram realizadas as análises.

Foram realizadas nove coletas de animais e água, sendo estas compreendidas entre os meses de fevereiro de 2009 e dezembro de 2010. Nessas coletas foram capturados 19 jundiás, 12 carpas e 04 acarás,

totalizando 35 animais, dos quais 23 provenientes do LAPEP e quatro de cada um dos rios analisados.

4.2 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS

Após as amostras chegarem ao laboratório, foram verificadas algumas características morfométricas dos animais, como peso, comprimento total (CT), comprimento padrão (CP), tamanho do intestino (TI) (Figura 3), utilizando um ictiômetro (Aquatic Eco-systems, inc., modelo régua de 60 cm).

Figura 3. Espécime de carpa comum em ictiômetro para medição do comprimento total, comprimento padrão e tamanho do intestino.



Os peixes foram abertos longitudinalmente na porção ventral e os órgãos internos retirados com auxílio de material cirúrgico estéril (Figura 4), conforme descrito por Molinari et al (2003).

Figura 4. Abertura ventral de um espécime de jundiá para a coleta do intestino.



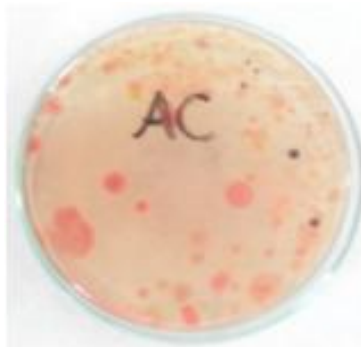
Para a coleta do conteúdo gastrintestinal, o intestino foi aberto com bisturi, o conteúdo da luz intestinal foi coletado com espátula e transferido para tubos de centrífuga tipo Falcon contendo 9 mL de solução salina fosfatada

(PBS) estéril na presença de bolas de vidro de 4 mm de diâmetro, e, em seguida, homogeneizado por 3 a 5 min. Todos os procedimentos acima foram realizados assepticamente (MOLINARI et al, 2003).

Os conteúdos intestinais obtidos após a homogeneização, e a água de cultivo foram diluídos até a concentração de 10^{-3} em 9 mL de solução salina (NaCl) estéril 0,9%. Em seguida, alíquotas de 100 µl das diferentes diluições foram semeadas em placas de Petri contendo ágar MacConkey (Himedia-India), como meio de cultura seletivo para bactérias gram-negativas, e ágar sangue (Himedia-India), em duplicata, e incubadas a 28 °C por 48 h (MURRAY et al., 1995).

Além disso, 1 mL dos conteúdos obtidos de cada animal e 1 mL da água de cultivo foi transferido para tubo contendo 5 mL de água peptonada alcalina, meio de enriquecimento para *Vibrio* spp., e incubado por 24 h a 28°C (PEREIRA et al., 2007). Após esse período, 100 µl dessa solução foram semeados em meio de cultivo ágar TCBS (Himedia-India), meio seletivo para o isolamento de *Vibrio* spp, e novamente incubados por 24 h a 28 °C (Figura 5).

Figura 5. Placa de petri com o meio de cultura MacConkey mostrando crescimento bacteriano após 48h de incubação a 28 °C.



Após a incubação, as colônias bacterianas foram triadas por características fenotípicas como: morfologia, cor, aspecto e tamanho das colônias, e submetidas ao teste de coloração de Gram. As colônias gram negativas foram repicadas para uma nova placa contendo ágar MacConkey (MURRAY et al., 1995), o qual foi incubado nas mesmas condições descritas anteriormente, e, em seguida armazenadas em geladeira, para a posterior identificação por testes bioquímicos.

4.3 IDENTIFICAÇÃO POR TESTES BIOQUÍMICOS

A identificação bacteriana por características do metabolismo bacteriano (provas bioquímicas) foi realizada por meio da utilização de dois kits comerciais de identificação, seguindo as instruções do fabricante. As cepas armazenadas em geladeira foram, inicialmente, reativadas, sendo repicadas para o meio de cultura Caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Himedia-india), e incubadas por 24 h a 28 °C. Após o período de incubação, 100 µl de cada amostra foi inoculado em placa de Petri contendo ágar MacConkey, espalhada sobre a superfície do meio e novamente incubada a 28 °C por 24 h. Ao final do período de incubação, uma colônia bem isolada de cada uma das amostras foi repicada para o kit de identificação, de acordo com as instruções do fabricante, e novamente incubada.

O kit de identificação da empresa Laborclin chamado Bactray é dividido em três conjuntos de provas bioquímicas distintas. O kit baseia-se na realização de 20 provas bioquímicas para isolados oxidase negativos e nove provas para os isolados oxidase positivos. O sistema 1 e 2 são utilizados para isolados oxidase negativos. A avaliação desse sistema ocorre através dos testes de orto-nitrofenol (ONPG), arginina di-hidrolase (ADH), lisina descarboxilase (LDC), ornitina descarboxilase (ODC), produção de ácido sulfúrico (H₂S), uréia (URE), Voges-Proskauer (VP), L-fenilalanina (PD), indol (IND) e citrato (CIT) e a avaliação do sistema 2 ocorre através dos testes de malonato (MAL), rhamnose (RHA), adonitol (ADO), salicina (SAL), arabinose (ARA), inositol (INO), sorbitol (SOR), sacarose (SAC), manitol (MAN) e rafinose (RAF). Já o sistema 3 é utilizado para isolados oxidase positivos, onde a avaliação ocorre através dos testes de cetrimida (CET), acetamida (ACE), malonato (MAL), citrato (CIT), maltose (MLT), esculina (ESC), L-arginina (ARG), uréia (URE) e indol (IND).

O kit de identificação para enterobactérias da Newprov (Pinhais – PR) consiste em cinco tubos contendo meio de EPM, caldo de lisina, meio de Mio, Ágar citrato de Simmons e caldo rhamnose, nos quais são utilizados as seguintes provas bioquímicas: desaminação do L-triptofano (LTD), produção de gás sulfídrico (H₂S), fermentação da glicose (GLI), produção de gás a partir da glicose (GAS), descarboxilação da L-lisina (LIS), produção de indol (IND),

descarboxilação da ornitina (ORN), motilidade (MOT), utilização de citrato como única fonte de carbono (CIT), fermentação da rhamnose (RHA).

Para ambos os kits, a interpretação do resultado visual das reações foi realizada conforme instrução dos fabricantes, permitindo a identificação fenotípica dos isolados.

Após a identificação bacteriana, os isolados foram repicados para meio BHI (Himedia-India) e incubados por 24 h a 28 °C. Após esse período, 250 µl do meio de cultivo com o crescimento bacteriano foi adicionado à mesma quantidade de glicerol 50%, homogeneizado e armazenado em freezer -80 °C para utilização em análises futuras. O restante foi mantido em geladeira para posterior crescimento em meio de cultura sólido com a finalidade de utilizar colônias bacterianas isoladas para a extração de DNA.

4.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS

4.4.1 Extração de DNA de colônias isoladas

Para a extração de DNA das colônias isoladas, foi utilizada a técnica de extração por fervura (AGERSBORG, REIDUM, MARTINEZ, 1997)

Inicialmente fez-se uma suspensão da colônia bacteriana a ser utilizada em 500 µl de água ultra pura estéril. Em seguida, a solução obtida foi homogeneizada e transferida para banho-maria por 15 min a 100 °C. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi coletado.

Posteriormente, a verificação da eficácia da extração foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1% preparado em tampão TBE (40 mM Tris, 40 mM Ácido bórico, 1 mM EDTA pH 8,0), corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL e fotografado com sistema digital KODAK EDAS 290. As amostras foram armazenadas em freezer -20 °C até a sua utilização para amplificação do gene RNAr 16S.

4.4.2 Amplificação do gene RNAr 16S

O gene RNAr 16S foi amplificado pelo método da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os *primers* F-968-GC (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGGAACGCGAAGAACCTTAC-3') e o R-1401 (5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3'), conforme descrito por Nubel et al. (1996), com o objetivo de amplificar uma sequência de aproximadamente 433 pares de bases (pb).

Foi feita a amplificação do DNA por PCR *touchdown* com 10 ciclos com temperatura de hibridação de 68 °C e decréscimo de um grau por ciclo, até atingir 58 °C. Após uma desnaturação inicial a 94 °C durante 3 min foram realizados mais 30 ciclos de amplificação, incluindo desnaturação a 94 °C por 20 s, hibridação a 58 °C por 20 s e extensão a 72 °C por 30 s, seguidos de uma extensão final durante 7 min a 72 °C. O volume final de cada reação foi de 25 µl, como descrito na tabela 1.

Tabela 1. Componentes da reação de PCR para amplificação do gene RNAr 16S e suas concentrações

Componentes	Volume na reação	Concentração	Concentração final
Tampão PCR	2,5 µl	10x	1 x
MgCl ₂	1,0 µl	50 mM	2 mM
dNTP	4,0 µl	1,25 mM/µl	0,2 mM
Iniciador direto	1,25 µl	10 pmol/µl	0,5 pmol
Iniciador inverso	1,25 µl	10 pmol/µl	0,5 pmol
Taq polimerase	0,2 µl	5 U	0,04 U
DNA	2,0 µl	Variável	Variável
Água ultra pura	12,8 µl	-	-
Total	25 µl	-	-

O preparo das misturas para reação da PCR foi feito em fluxo laminar após irradiação de 15 min com luz ultravioleta sobre os tubos, ponteiras e pipetas previamente autoclavados.

Em cada reação de PCR, além das amostras utilizadas, também foi feito um controle negativo no qual o DNA era substituído por água ultra pura, e um controle positivo, com DNA de *E. coli* ATCC 25922.

Os produtos de amplificação (5 µl) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% preparados em tampão TBE, corados e fotografados para identificação e comparação das bandas amplificadas, utilizado um padrão de

peso molecular, variando de 50 pb a 1350 pb (50 pb DNA Ladder Uniscience).

O restante do produto de PCR das amostras foi purificado por precipitação com acetato de amônia 7,5 M de acordo com protocolo descrito por Somerville et al. (1989) modificado, e armazenado em freezer -20 °C até sua utilização.

Para a purificação, foi adicionado 2/3 do volume do produto de PCR de acetato de amônio 7,5 M e 2x o volume do produto de PCR de etanol absoluto. Posteriormente, essa solução foi homogeneizada por inversão e incubada em temperatura ambiente por 20 min. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 13000 rpm por 15 min e descartado o sobrenadante. O precipitado foi lavado com 200 µl de álcool 70%, agitando levemente. A amostra foi novamente centrifugada a 13000 rpm por 5 min, eliminado o sobrenadante e esperou-se secagem em temperatura ambiente.

Após seco o precipitado, o DNA foi ressuspensão em 20 µl de água ultra pura estéril e foi verificada presença de DNA em gel 1,5% corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL.

4.4.3 Sequenciamento dos amplicons

Após a purificação, foi feita a reação de sequenciamento utilizando os mesmos *primers* e o mesmo programa descrito anteriormente, porém com a concentração dos iniciadores de 5 pmol/µl.

Para a reação de sequenciamento foi utilizado 5 µl do produto amplificado e purificado; 4 µl de reativo *Dyynamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* da GE Life Science (composto por enzima, dNTPs, ddNTPs marcados com fluorescência e tampões) e 1 µl de iniciador direto ou reverso, totalizando um volume final de 10 µl.

Após a reação de seqüenciamento, o produto obtido foi purificado por precipitação com acetato de amônia 7,5 M, e, em seguida, as amostras foram ressuspensas em 10 µl de “loading buffer for MegaBACE”, para posterior análise em seqüenciador automático MegaBace 1000.

Os parâmetros de injeção dos fragmentos de PCR no sequenciador foram de 3 kV por 80 s, e os parâmetros durante a corrida foram de 9 kV por 120 min a 25 °C.

4.4.4 Análise das sequências

Os eletroferogramas gerados pelo sequenciador foram analisados com o uso do software *Chromas lite 201* (Technelysium Pty Ltd), e suas sequências comparadas com sequências depositadas nas bases de dados RDP (<http://rdp.cme.msu.edu>) e BLAST do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

4.5 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

O teste de susceptibilidade a antibióticos foi realizado pela técnica de difusão em ágar (Kirby-Bauer) para os isolados bacterianos previamente identificados pelos kits.

A escolha dos antimicrobianos foi baseada nos antibióticos preditores das classes utilizadas na medicina humana e animal no tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas.

Os antibióticos testados e suas respectivas quantidades foram: ampicilina (AMP; 10µg), gentamicina (GEN; 10µg), ertapenem (ETP; 10µg), ácido nalidíxico (NAL; 30µg), sulfametazol/trimetropim (SUT; 25µg), cefalotina (CFL; 30µg), cefoxitina (CFO; 30µg), ceftriaxona (CRO; 30µg), cefepime (COM; 30µg) e tetraciclina (TET; 30µg).

Os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2006, documento M2-A9. Inicialmente, as colônias a serem analisadas foram reativadas. Para tal, foram semeadas em caldo BHI e incubadas por 24 h a 28 °C. Após o crescimento, 100 µl de cada amostra foram semeados em ágar MacConkey e novamente incubados por 24 h a 28 °C.

Em seguida, 3 a 5 colônias provenientes do MacConkey de morfologia semelhantes foram suspensas em solução salina 0,9% estéril com auxílio de

alça bacteriológica até atingir a concentração final de 0,5 da escala de MacFarland correspondente a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

O inóculo foi semeado em placa contendo uma camada de 3 mm a 4 mm de ágar Muller Hinton (Himedia-India) preparado de acordo com o manual do fabricante. Em seguida, discos impregnados com os antimicrobianos foram distribuídos equidistantes na placa e estas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Após incubação, iniciou-se a leitura dos halos de inibição com auxílio de paquímetro digital.

O controle de qualidade do método foi realizado utilizando-se as cepas de referência *E. coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. A interpretação dos dados foi realizada comparando os halos de inibição obtidos com os de referência do manual do CLSI 2010, documento M100-S20, para a classificação do microrganismo em sensível (S) ou resistente (R) quanto a frequência de resistência para cada antimicrobiano testado.

Para a análise dos resultados da frequência de resistência bacteriana aos antibióticos, cepas que possuem resistência natural ou intrínseca foram desconsideradas, de acordo com dados de Livermore e colaboradores (2001), sendo elas *Aeromonas hydrophyla* intrinsecamente resistente a ampicilina; *Citrobacter freundii* intrinsecamente resistente a cefalotina e cefoxitina; *Serratia* spp. intrinsecamente resistente a cefalotina; *Enterobacter* spp. intrinsecamente resistente a cefalotina e cefoxitina; *Pseudomonas* sp. intrinsecamente resistentes a β -lactâmicos e tetraciclina.

Para cada isolado identificado, foi calculado o índice de múltipla resistência aos antimicrobianos (MAR). O índice de múltipla resistência, quando aplicado a um único isolado, é definido como a/b, onde “a” representa o número de antibióticos para qual o isolado foi resistente, e “b” representa o número de antibióticos para o qual o isolado foi exposto. Quando o MAR for maior que 0,2, considera-se que este isolado é originado de local com alto risco de contaminação humana ou de criações comerciais, tais como suínos, aves e gados leiteiros. Isolados com índices de MAR igual ou inferior a 0,2 são considerados com origem em locais onde os antibióticos raramente ou nunca foram utilizados (KRUMPERMAN, 1983).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada, predominantemente, de modo descritivo com apresentação de gráficos e tabelas.

Para a análise estatística dos dados de frequência de resistência bacteriana aos antibióticos, foram feitas comparações entre os locais de coleta. Para isso foi utilizado o teste de Qui-Quadrado, com correção de Yates ou teste exato de Fisher quando necessário, e o nível de significância adotado foi 0,05. Os dados foram analisados com o programa computacional Statgraphics 4.1.

As comparações realizadas quanto a frequência de resistência aos antimicrobianos foram: frequência de resistência entre todos os pontos de coleta considerando todos os antibióticos testados; frequência de resistência entre isolados bacterianos obtidos a partir das coletas de jundiá e água (LAPEP, Rio Barigui e Rio Pequeno); frequência de resistência entre isolados de carpas versus jundiá obtidos do LAPEP; e frequência de resistência levando em consideração todos os pontos de coleta para cada um dos antibióticos testados.

5 RESULTADOS

5.1 ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E EXTRAÇÃO DO DNA BACTERIANO

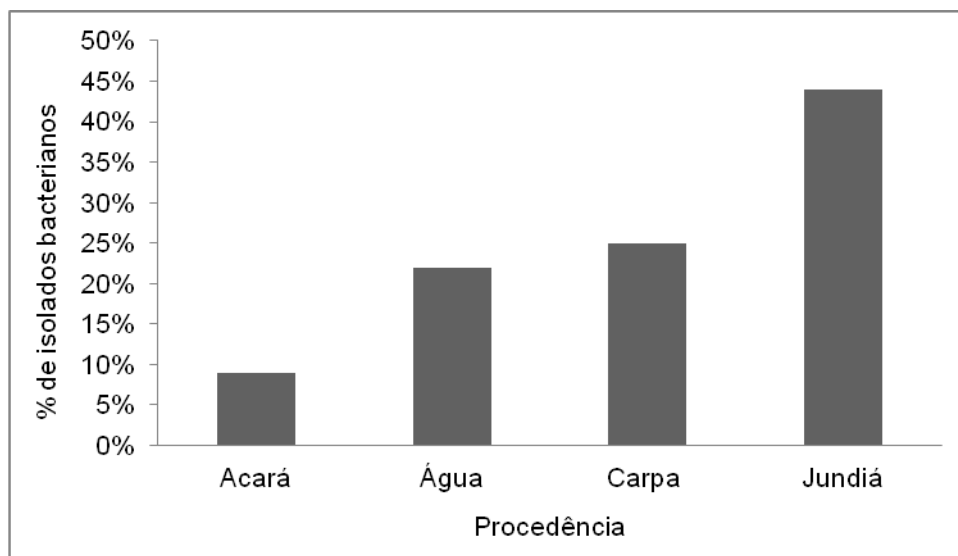
Considerando-se os quatro pontos de coleta dos animais, foram isoladas 320 colônias bacterianas. Deste total, 130 (40,6%) puderam ser identificadas por métodos fenotípicos (confiabilidade superior a 80%), e para as 190 restantes (59,4%), não foi possível a atribuição confiável de identidade, pois a confiabilidade dos dados foi inferior a 80%, de acordo com recomendações do fabricante.

Das 320 colônias isoladas, 197 foram provenientes do LAPEP, 40 do Rio Barigui, 40 do Rio Irai e 43 do Rio Pequeno. Dos 23 animais e das amostras de água do LAPEP foram identificadas 80 colônias, dos demais pontos de coleta foram identificadas 50 colônias bacterianas. O percentual de colônias isoladas

dos diferentes pontos de coleta variou de 27,5% no Rio Iraí a 47,5% do Rio Barigui.

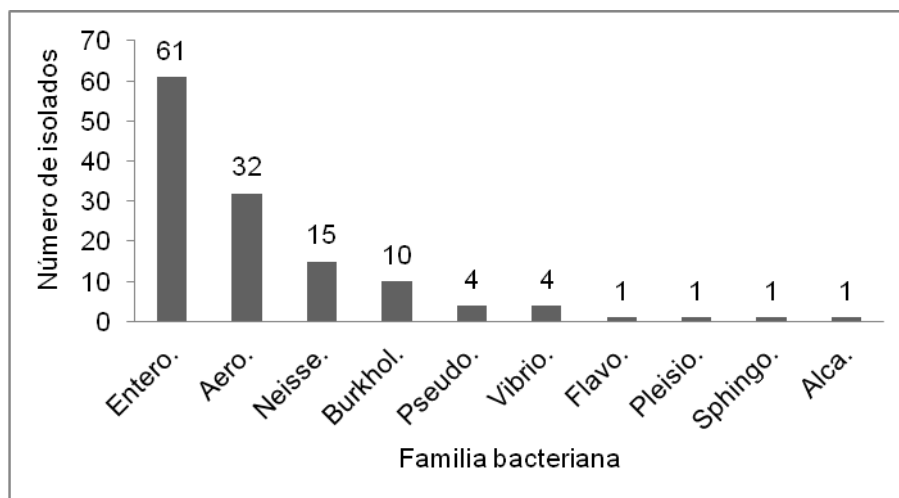
O número de colônias isoladas dos respectivos sítios de coleta (peixe ou água) estão demonstrados na Figura 6. Dessas colônias, as oriundas do acará apresentaram maior proporção de identificação (77,4%), seguidas da carpa (62,8%), do jundiá (57,4%) e da água (51,4%).

Figura 6. Porcentagem de bactérias isoladas e identificadas por testes bioquímicos para cada peixe ou amostra de água coletada.



A Figura 7 representa o número de isolados bacterianos obtidos para cada uma das famílias bacterianas isoladas. As famílias bacterianas mais representadas foram a Enterobacteriaceae, com 47% das cepas identificadas, seguido da Aeromonadaceae, com 24,6% e da Neisseriaceae, com 11,5%.

Figura 7. Número de cepas bacterianas identificadas bioquimicamente para cada uma das famílias isoladas.



Legenda: Os valores sobre as barras representam o número de bactérias identificadas para cada uma das famílias bacterianas encontradas. Entero: Enterobacteriaceae; Aero: Aeromonadaceae; Neisse: Neisseiraceae; Burkhol: Burkholderiaceae; Pseudo: Pseudomonadaceae; Vibrio: Vibrionaceae; Flavo: Flavobacteriaceae; Pleisio: Pleisiomonadaceae; Sphingo: Sphingomonadaceae; Alca: Alcaligenaceae.

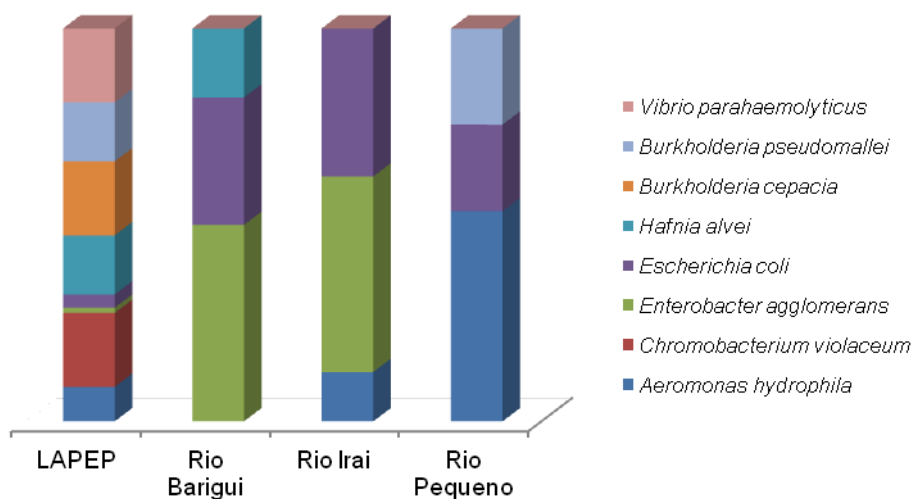
Das bactérias identificadas bioquimicamente, 36,6% das espécies foram isoladas somente das amostras de água, sendo elas: *Bergeyella zoohelcum*; *Bordetella bronchiseptica*; *Citrobacter amalonaticus*; *Klebsiella ozeanae*; *Klebsiella pneumoniae* *Providencia stuartii*; *Salmonella enteritidis* biotipo *paratyphi A*; *Shigella sonnei*; *Sphingomonas paucimobilis*; *Morganella morgani* e *Rahnella aquatilis*.

Da mesma forma, 40% das espécies identificadas bioquimicamente puderam ser isoladas somente do intestino dos peixes, sendo elas: *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca*; *Kluyvera kriocrescens*; *Pleisiomonas shigelloides*; *Proteus vulgaris*; *Providencia alcalifaciens*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Pseudomonas stutzeri*; *Salmonella choleraesuis*; *Salmonella* grupo 3 A; *Serratia liquefaciens* e *Vibrio parahaemolyticus*.

23,4% das espécies identificadas bioquimicamente puderam ser encontrados tanto na água quanto no intestino dos peixes, sendo eles: *Aeromonas hydrophila*; *Burkholderia cepacia*; *Burkholderia pseudomallei*; *Chromobacterium violaceum*; *Enterobacter agglomerans*; *Escherichia coli* e *Hafnia alvei*.

A Figura 8 apresenta as oito espécies bacterianas encontradas com maior frequência nas coletas realizadas.

Figura 8. Distribuição das 08 (oito) espécies bacterianas mais abundantes identificadas, no total das amostras, em relação a todos os pontos de coleta, levando em consideração isolados de água e dos peixes.



As espécies bacterianas identificadas com maior frequência foram: *A. hydrophila* com 24,6%, *Chromobacterium violaceum* com 11,5%, *Enterobacter agglomerans* com 10,7%, *Escherichia coli* com 8,4%, e *Hafnia alvei* representando 7,6% do total das colônias identificadas (Tabela 2).

Tabela 2. Bactérias caracterizadas pelos kits de identificação e quantidade por local amostrado, levando em consideração amostras da água e dos peixes.

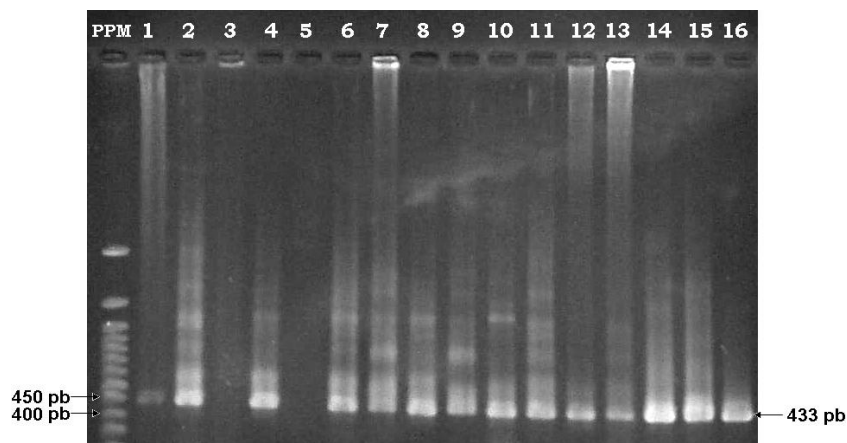
	LAPEP	Rio Barigui	Rio Iraí	Rio Pequeno	TOTAL	%
<i>Aeromonas hydrophila</i>	15	0	3	14	32	24,6
<i>Bergeyella zoohelcum</i>	1	0	0	0	1	0,7
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	1	0	0	0	1	0,7
<i>Burkholderia cepacia</i>	5	0	0	0	5	3,8
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	4	0	0	1	5	3,8
<i>Chromobacterium violaceum</i>	15	0	0	0	15	11,5
<i>Citrobacter freundii</i>	2	1	0	0	3	2,3
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1	0	0	0	1	0,7
<i>Enterobacter agglomerans</i>	1	8	5	0	14	10,7
<i>Escherichia coli</i>	2	4	3	2	11	8,4
<i>Hafnia alvei</i>	8	2	0	0	10	7,6
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	0	0	0	1	0,7
<i>Klebsiella ozeanae</i>	1	2	0	0	3	2,3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	0	0	0	1	0,7
<i>Kluyvera kriocrescens</i>	3	0	0	0	3	2,3
<i>Morganella morganii</i>	0	0	0	1	1	0,7
<i>Pleisiomonas shigelloides</i>	1	0	0	0	1	0,7
<i>Proteus vulgaris</i>	1	0	0	0	1	0,7
<i>Providencia alcalifaciens</i>	2	0	0	0	2	1,5
<i>Providencia stuartii</i>	0	0	0	1	1	0,7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	0	0	0	3	2,3
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1	0	0	0	1	0,7
<i>Rahnella aquatilis</i>	1	0	0	0	1	0,7
<i>Salmonella choleraesuis</i>	3	0	0	0	3	2,3
<i>Salmonella enteritidis</i> biotipo <i>paratyphi A</i>	0	1	0	0	1	0,7
<i>Salmonella</i> grupo 3a	1	0	0	0	1	0,7
<i>Serratia liquefaciens</i>	2	0	0	0	2	1,5
<i>Shigella sonnei</i>	0	1	0	0	1	0,7
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	0	0	0	1	1	0,7
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	4	0	0	0	4	3,0
Identificadas	80	19	11	20	130	40,7
Não identificadas	117	21	29	23	190	59,3

O DNA das 320 colônias bacterianas foi extraído e armazenado em freezer -80 °C fazendo parte de um banco de DNA que será utilizado em estudos futuros.

5.2 AMPLIFICAÇÃO PARCIAL DO GENE RNAr 16S

As 320 colônias bacterianas isoladas foram submetidas com sucesso à amplificação por PCR de um fragmento de 433 pb do gene RNAr 16S, utilizando-se os primers F-968-GC e R-1401 (Figura 9).

Figura 9. Perfil eletroforético da amplificação do gene RNAr 16S de bactérias isoladas do intestino de peixes de água doce, em gel de agarose 1,5%.



PPM: padrão de peso molecular com escada de 100 pb. Amostras 1 a 16: produtos de amplificação do gene RNAr 16S.

5.3 SEQUENCIAMENTO DOS AMPLÍCONS

Para a identificação molecular das bactérias por meio do gene RNAr 16S, o produto da amplificação por PCR foi submetido ao sequenciamento do DNA para comparação com sequências depositadas em bases de dados distintos, o BLAST e o RDP.

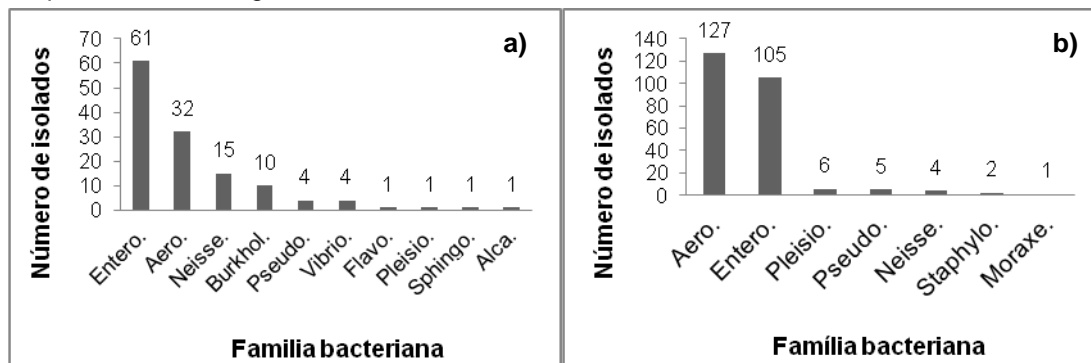
Das 320 cepas bacterianas submetidas ao sequenciamento, 253 puderam ser identificadas, sendo que as restantes apresentaram sequências de má qualidade que não puderam ser alinhadas com nenhuma das dispostas nos bancos de dados utilizados.

Dentre as amostras que puderam ser identificadas com a utilização dessa técnica, incluem-se 122 que não haviam sido identificadas com o auxílio de kits de identificação, sendo que o comprimento médio das sequências de DNA do gene 16S RNAr obtidas foram de 350 pb e apresentaram identidade superior a 97% com as sequências depositadas nos bancos de dados.

Dos isolados que haviam sido identificados com kits, 42% foram confirmadas pelo sequenciamento de seu DNA pertencentes ao gênero ou espécie classificado anteriormente por características fenotípicas e bioquímicas, entretanto, houve discrepância nos resultados de caracterização obtidos por kits de identificação e de sequenciamento, quanto a representatividade das famílias encontradas (Figura 10). Pode-se observar que

algumas famílias identificadas com o auxílio de kits de identificação não foram contempladas pelo sequenciamento do DNA.

Figura 10. Famílias bacterianas identificadas por diferentes metodologias. a) famílias bacterianas identificadas com auxílio de kits comerciais; b) famílias bacterianas identificadas pelo sequenciamento do gene 16S RNAr.

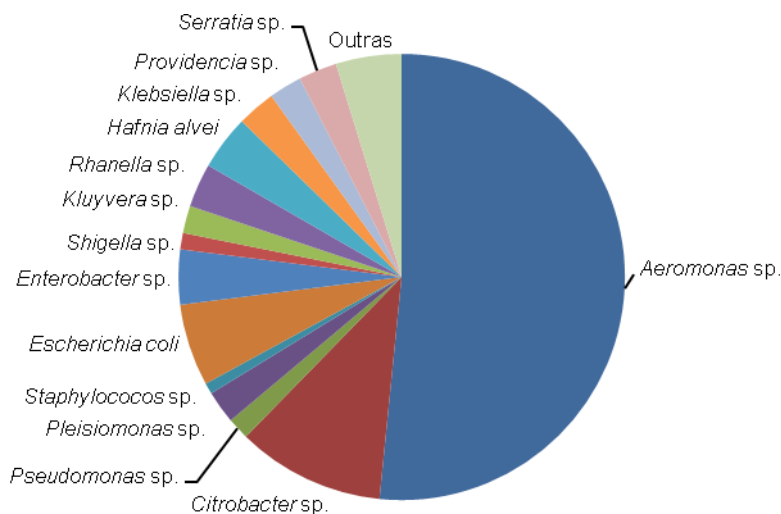


Legenda: Os valores sobre as barras representam o número de bactérias identificadas para cada uma das famílias bacterianas encontradas. Entero: Enterobacteriaceae; Aero: Aeromonadaceae; Neisse: Neisseiraceae; Burkhol:Burkholderiaceae; Pseudo: Pseudomonadaceae; Vibrio: Vibrionaceae; Flavo: Flavobacteriaceae; Pleisio: Pleisiomonadaceae; Sphingo: Sphingomonadaceae; Alca: Alcaligenaceae; Staphylo: Staphylococcaceae; Moraxe: Moraxellaceae.

Com o sequenciamento parcial do gene RNAr 16S, puderam ser identificadas cepas bacterianas de 07 (sete) famílias diferentes. Destas, 50% são pertencentes à Aeromonadaceae, 41,5% pertencentes à Enterobacteriaceae, 2,5% à Pleisiomonadaceae, 2% à Pseudomonadaceae, 1,5% à Neisseriaceae, 0,8% à Staphylococcaceae e 0,4% à Moraxellaceae. (Figura 10b).

A figura 11 apresenta as principais bactérias que puderam ser identificadas pelo sequenciamento do gene 16S RNAr. Pode-se observar que a maioria das cepas bacterianas isoladas pertencem a espécie *Aeromonas* sp., seguido de *Citrobacter* sp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp. e *Hafnia alvei*.

Figura 11. Distribuição das espécies bacterianas identificadas pelo sequenciamento do gene RNAr 16S dentre os 320 isolados analisados.

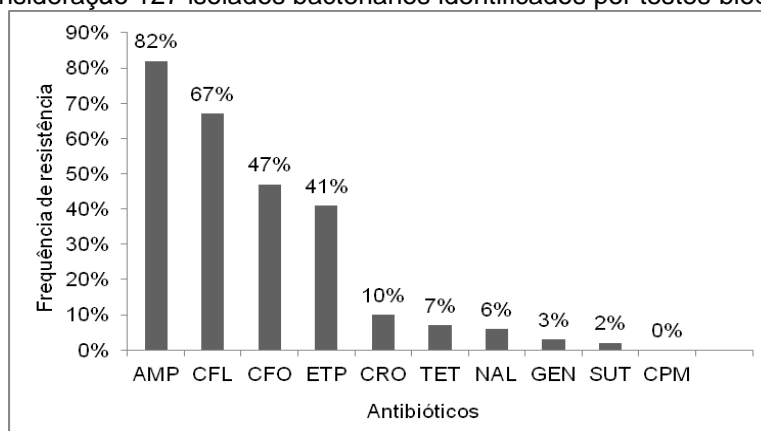


5.4 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

Das 130 colônias bacterianas identificadas fenotipicamente, 127 foram submetidos ao teste de resistência aos antimicrobianos, sendo que 31 foram provenientes das amostras de água e 96 do intestino dos peixes.

O antibiótico que mais apresentou isolados resistentes foi a ampicilina (82%), seguido da cefalotina (67%) e da cefoxitina (47%) enquanto que cefepime não apresentou nenhuma cepa resistente. As percentagens de resistência a cada um dos antibióticos testados são apresentadas na Figura 12.

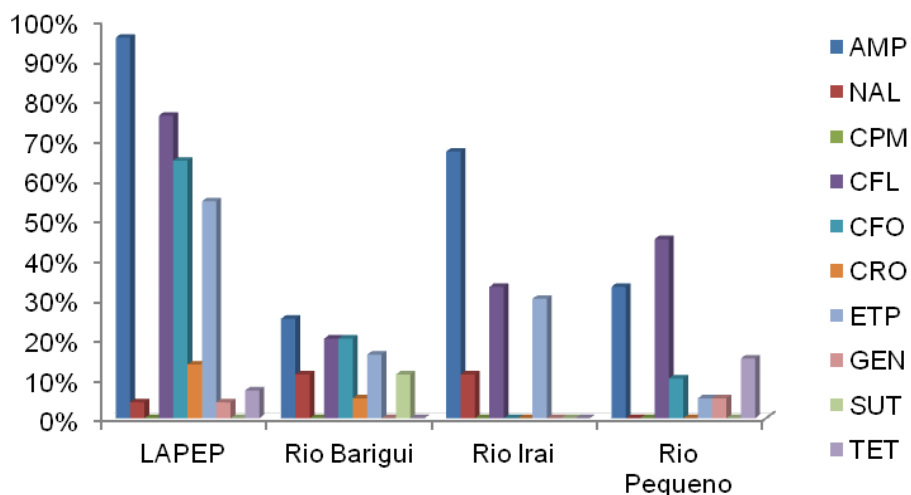
Figura 12. Percentagem de isolados resistentes para cada um dos antibióticos testados, levando em consideração 127 isolados bacterianos identificados por testes bioquímicos.



Legenda: Os valores sobre as barras representam a frequência de resistência observada para cada um dos antibióticos testados. AMP: ampicilina; CFL: cefalotina; CFO: cefoxitina; ETP: ertapenem; CRO: ceftriaxona; TET: tetraciclina; NAL: ácido nalidixico; GEN: gentamicina, SUT: sulfametazol/trimetopim; CPM: cefepime.

A figura 13 apresenta a frequência de resistência aos antibióticos testados, quando considerados todos os pontos de coleta. A maior ocorrência de resistência foi observada em condições de cultura (LAPEP), e a menor no curso d'água com mais baixo grau de ação antrópica (Rio Pequeno).

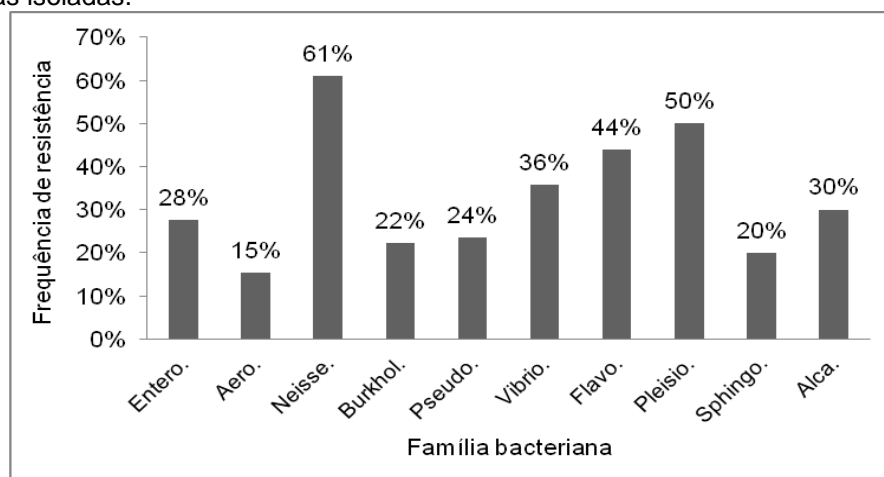
Figura 13. Frequência de resistência aos antibióticos apresentada pelas bactérias identificadas bioquimicamente para cada um dos pontos de coleta amostrados.



Legenda: AMP: ampicilina; NAL: ácido nalidíxico; CPM: cefepime; CFL: cefalotina; CFO: cefoxitina; CRO: ceftriaxona; ETP: ertapenem; GEN: gentamicina; SUT: sulfametazol/trimetopim; TET: tetraciclina.

Quanto à frequência de ocorrência de resistência por família bacteriana isolada, percebe-se que a família Neisseriaceae foi a que apresentou maior incidência de resistência (61%), seguida da família Pleisiomonadaceae (50%). A família bacteriana que apresentou maior sensibilidade aos antibióticos testados foi Aeromonadaceae (15%). (Figura 14).

Figura 14. Incidência de resistência aos antibióticos levando em consideração as famílias bacterianas isoladas.

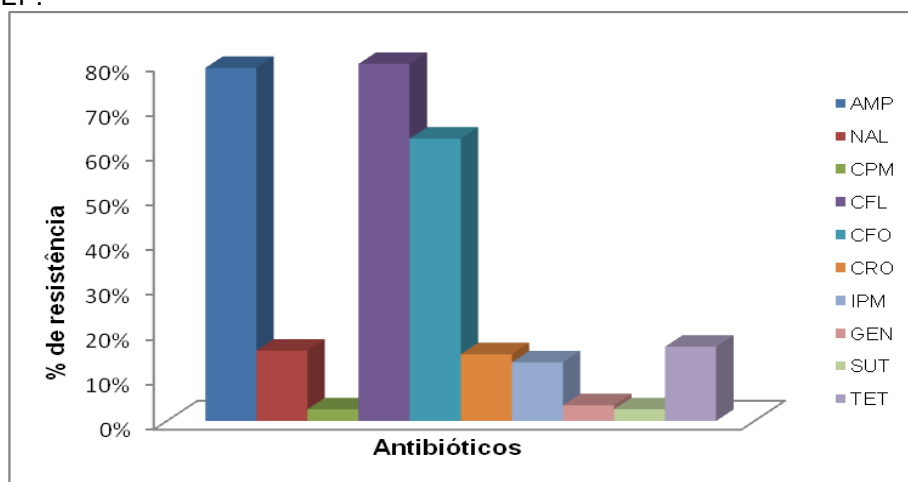


Legenda: os valores sobre as barras representam a frequência de ocorrência de resistência bacteriana para a respectiva família bacteriana. Aero: Aeromonadaceae; Entero: Enterobacteriaceae; Pleisio: Pleisiomonadaceae; Pseudo: Pseudomonadaceae; Neisse: Neisseiraceae; Staphylo: Staphylococcaceae; Moraxe: Moraxellaceae.

Já o perfil de resistência bacteriana dos isolados não identificados fenotipicamente encontra-se nas figuras 15 e 16.

Na figura 15 está representado o perfil de resistência aos antibióticos de 114 cepas bacterianas de peixes oriundos de uma piscicultura da região metropolitana de Curitiba, sendo que 58 cepas foram isoladas de jundiá e 56 de carpa. Os resultados obtidos demonstram que as bactérias analisadas apresentaram maior perfil de resistência aos antibióticos ampicilina (78,9%), cefalotina (79,8%) e cefoxitina (63,1%). Já os antibióticos cefepime e sulfametazol/trimetropim, apresentaram os menores índices de resistência, sendo de 2,6% para ambos.

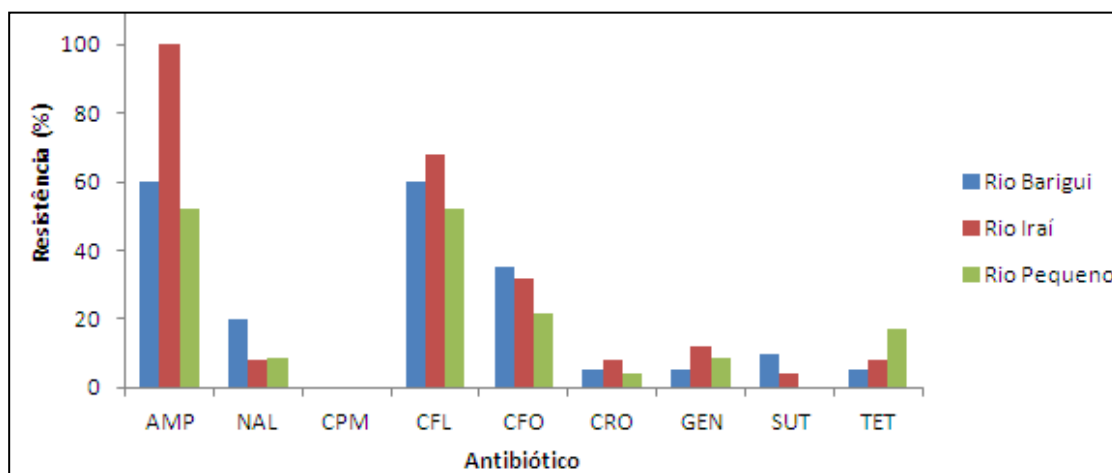
Figura 15: Perfil de resistência aos antibióticos de 114 cepas bacterianas isoladas de peixes do LAPEP.



Legenda: AMP: ampicilina; NAL: Ácido nalidixico; CPM: cefepime; CFL: cefalotina; CFO: cefoxitina; CRO: ceftriaxona; IPM: imipenem; GEN: gentamicina; SUT: sulfametazol/trimetropim; TET: tetraciclina.

Na figura 16 está representado o perfil de resistência aos antibióticos de bactérias isoladas e não identificadas dos rios Barigui, Iraí e Pequeno, sendo 20 amostras provenientes do rio Barigui, 20 amostras do rio Iraí e 25 amostras do Rio Pequeno.

Figura 16: Perfil de resistência aos antibióticos de bactérias isoladas e não identificadas fenotipicamente provenientes dos rios Barigui, Iraí e Pequeno.



Legenda: AMP: ampicilina; NAL: Ácido nalidixico; CPM: cefepime; CFL: cefalotina; CFO: cefoxitina; CRO: ceftriaxona; IPM: imipenem; GEN: gentamicina; SUT: sulfametazol/trimetropim; TET: tetraciclina.

Os resultados obtidos demonstram um maior perfil de resistência aos antibióticos ampicilina, cefalotina e cefoxitina, sendo que o rio que apresentou maior frequência de bactérias resistentes foi o Iraí.

Quanto ao índice de múltipla resistência aos antimicrobianos (MAR), analisando os resultados dos isolados de todas as coletas, 58,7% apresentaram MAR superior a 0,2 e 41,3% menor ou igual a 0,2, sendo que o ponto de coleta com o maior número de isolados multirresistentes foi o LAPEP (78%) e o menor foi o Rio Iraí (10%).

Os índices de MAR por ponto de coleta e por procedência do isolamento bacteriano estão dispostos nas tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3. Número de isolados para cada um dos índices de MAR obtidos, analisados por pontos de coleta.

LOCAL/MAR	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	% MAR
LAPEP	5	12	16	17	15	11	1	1	78
Rio Barigui	10	3	3	2	0	0	0	0	28
Rio Iraí	3	6	1	0	0	0	0	0	10
Rio Pequeno	9	4	7	0	0	0	0	0	35
TOTAL	27	25	27	19	15	11	1	1	59

Comparando-se o índice de MAR entre os isolados obtidos do intestino dos peixes e dos obtidos da água, observa-se que 59,5% dos isolados do intestino apresentaram MAR superior a 0,2. Quanto à água, 58% apresentou índice de múltipla resistência superior a 0,2.

Tabela 4. Número de isolados para cada um dos índices de MAR obtidos, analisados por procedência de isolamento

PROCEDÊNCIA/MAR	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	% MAR
Água	5	8	8	5	4	1	0	0	58
Acará	3	3	1	0	0	0	0	0	14
Carpa	4	5	7	5	2	6	0	0	69
Jundiá	15	9	11	9	9	4	1	1	59
TOTAL	27	25	27	19	15	11	1	1	59

Os resultados obtidos com a realização da análise estatística em relação às comparações realizadas quanto a frequência de resistência aos antimicrobianos estão representadas nas tabelas 5 a 8.

Tabela 5. Valor de P das análises para a resistência microbiana dos isolados de todos os pontos de coleta, considerando os resultados obtidos para todos os antibióticos conjuntamente.

LAPEP x Barigui	LAPEP x Irai	LAPEP x Pequeno	Barigui x Irai	Barigui x Pequeno	Irai x Pequeno
0	0	0	Ns	ns	Ns

Legenda: ns: não-significativo

Tabela 6. Valor de P das análises para a resistência microbiana dos isolados de jundiá.

	LAPEP x Barigui	LAPEP x Pequeno	Barigui x Pequeno
AMP	0	0	ns
NAL	ns	Ns	ns
CPM	-	-	-
CFL	0	0,01	ns
CFO	0	0	ns
CRO	ns	Ns	-
ETP	0,02	0	ns
GEN	ns	Ns	ns
SUT	0,04	-	ns
TET	0,05	Ns	ns

Legenda: AMP: ampicilina; CFL: cefalotina; CFO: cefoxitina; ETP: ertapenem; CRO: ceftriaxona; TET: tetraciclina; NAL: ácido nalidíxico; GEN: gentamicina, SUT: sulfametazol/trimetopim; CPM: cefepime; ns: não-significativo.

Tabela 7. Valor de P das análises estatísticas para a resistência microbiana dos isolados de todos os pontos de coleta.

	LAPEP x Barigui	LAPEP x Irai	LAPEP x Pequeno	Barigui x Irai	Barigui x Pequeno	Irai x Pequeno
AMP	0	0,04	0	ns	ns	Ns
NAL	ns	ns	Ns	ns	ns	ns
CPM	-	-	-	-	-	-
CFL	0	0,03	0	ns	ns	ns
CFO	0	0	0	ns	ns	ns
CRO	ns	ns	0,04	ns	ns	-
ETP	ns	ns	Ns	ns	ns	ns
GEN	ns	ns	Ns	-	ns	ns
SUT	0	-	-	ns	ns	-
TET	ns	ns	Ns	-	ns	ns

Legenda: AMP: ampicilina; CFL: cefalotina; CFO: cefoxitina; ETP: ertapenem; CRO: ceftriaxona; TET: tetraciclina; NAL: ácido nalidíxico; GEN: gentamicina, SUT: sulfametazol/trimetopim; CPM: cefepime; ns: não-significativo.

Tabela 8. Valor de P das análises estatísticas para a resistência microbiana dos isolados de jundiá e carpa isolados do LAPEP.

	Jundiá x Carpa
AMP	Ns
NAL	0
CPM	-
CFL	0,02
CFO	0
CRO	Ns
ETP	Ns
GEN	Ns
SUT	-
TET	0,03

Legenda: AMP: ampicilina; CFL: cefalotina; CFO: ceftioxina; ETP: ertapenem; CRO: ceftriaxona; TET: tetraciclina; NAL: ácido nalidíxico; GEN: gentamicina, SUT: sulfametazol/trimetropim; CPM: cefepime; ns: não-significativo.

Resultados obtidos com a realização das análises estatísticas demonstraram diferença significativa em relação a ocorrência de resistência bacteriana aos antibióticos quando comparados os pontos de coleta LAPEP *versus* Rio Barigui, LAPEP *versus* Rio Irai e LAPEP *versus* Rio Pequeno levando em consideração todos os antibióticos (Tabela 5). Houve também diferença significativa quanto a resistência aos antibióticos ampicilina, cefalotina e ceftioxina; e os antibióticos ertapenem, gentamicina e sulfametazol/trimetropim quando comparados os resultados de resistência obtidos com bactérias isoladas do jundiá provenientes do LAPEP, do Rio Barigui e do Rio Pequeno (Tabela 6).

Quando comparados a frequência de resistência dos isolados de todos os pontos de coleta, os antibióticos que apresentaram diferença significativa foram ampicilina, cefalotina, ceftioxina, ceftriaxona e sulfametazol/trimetropim (Tabela 7).

Quando comparados a frequência de resistência obtidos com bactérias isoladas de carpas e jundiás do LAPEP, houve diferença significativa referente aos antibióticos ácido nalidíxico, cefalotina, ceftioxina e tetraciclina (Tabela 8).

6 DISCUSSÃO

Com as coletas realizadas, foi possível a captura da carpa comum, do jundiá e do acará. A carpa comum é uma espécie de alta rusticidade, nativa da Europa e sudeste da Ásia, de fácil manejo e crescimento rápido (CASTAGNOLLI & CYRINO, 1986). É onívora, com tendência a herbívora, tendo como alimentação natural o zooplâncton e organismos bentônicos (QUEROL et al., 2005). É muito difundida como peixe de criação em vários ambientes nos quais pode ser considerada espécie invasora.

Os exemplares de jundiá puderam ser capturados no LAPEP e nos rios Barigui e Pequeno, pois essa espécie é nativa da região sul do Brasil por se adaptar facilmente a climas frios, e, por esse motivo, é amplamente utilizada nas criações piscícolas. Os adultos desta espécie são onívoros no ambiente natural, tendo preferência por peixes, crustáceos, insetos, restos vegetais e detritos orgânicos, além de ser generalista com relação à escolha do alimento (GUEDES, 1980). Além disso, sabe-se que essa espécie vive em lagos e poços fundos dos rios, preferindo os ambientes de águas mais calmas com fundo de areia e lama, junto às margens e vegetação onde ficam escondidos entre pedras e troncos apodrecidos, de onde saem à noite, à procura de alimento (GUEDES, 1980; MEURER & ZANIBONI FILHO, 1997).

Quanto ao acará, foi possível sua captura apenas na represa do rio Iraí, pois essa espécie ocorre em ambientes de represa, lênticos e de inundação, lagoas costeiras e riachos (MESCHIATTI, 1995; ÁGUIARO & CARAMACSHI, 1998; SABINO & CASTRO, 1990). O acará é um peixe de hábitos onívoros, comendo uma ampla variedade de alimentos no fundo. Essa espécie tem preferência por ambientes de águas paradas, mas é também comum nos rios, especialmente nos remansos ou nas margens com vegetação abundante, sendo parente da tilápia e do tucunaré. É de natureza plástica e flexível, e por esse motivo é uma das poucas espécies que se adaptam muito bem às condições de reservatórios (VONO, 2000).

Sabe-se que o trato gastrintestinal de peixes é um complexo ecossistema, que, por ser rico em nutrientes se mostra um excelente meio para o desenvolvimento de microrganismos. Além de potenciais patógenos aos peixes, componentes dessa microbiota podem apresentar-se como potenciais

patógenos aos humanos, pois muitos são descritos como patógenos emergentes de importância crescente em alimentos. Sendo assim, é de grande importância conhecer e monitorar os componentes da microbiota intestinal de peixes, pois estudos nessa área são escassos, e, apesar de os peixes serem uma fonte de proteína saudável, também podem ser veículos de transmissão de doenças, não somente por sofrer deterioração rápida, mas também devido a diversos microrganismos patogênicos estarem presentes nesse alimento (FRANCO & LANDGRAF, 2002).

Comparando-se metodologias tradicionais de identificação bacteriana com metodologias molecular, percebe-se que as moleculares são mais eficazes, pois 122 colônias bacterianas que não puderam ser identificadas por métodos tradicionais o foram pelo sequenciamento, entretanto 42% das bactérias identificadas com auxílio de kits comerciais foram confirmadas pertencentes ao gênero a que haviam sido anteriormente classificadas, por técnicas moleculares.

Quando utilizadas metodologias tradicionais de identificação bacteriana, como características morfológicas, tintoriais e bioquímicas, e técnicas moleculares, as bactérias identificadas com maior frequência foram pertencentes às famílias Enterobacteriaceae e Aeromonadaceae, sendo que estas famílias também são as encontradas com maior frequência em outros estudos.

Esses dados são confirmados por Huber et al. (2004), que ressalta que, dentre os agentes bacterianos amplamente distribuídos no ambiente aquático, destacam-se aqueles pertencentes as famílias Aeromonadaceae cuja presença no ambiente pode ser reconhecida pela sua detecção na pele, brânquias e intestino, e, quando ocorre desequilíbrio no sistema bactéria-hospedeiro-ambiente, podem estar envolvidos como agentes etiológicos primários, e Enterobacteriaceae.

Molinari e colaboradores (2003) citam as bactérias *Aeromonas hydrophila*, *A. veronii*, *Burkholderia cepacia*, *C. violaceum*, *C. freundii*, *E.coli*, *Flavimonas oryzihabitans* e *P. shigelloides* como as mais comumente encontradas no estômago e no intestino da tilápia do Nilo. DePaola et al. (1995) estudando o efeito do antibiótico oxitetraciclina em bactérias gram-negativas isoladas do intestino e da água de tanques de peixe gato, puderam

isolar as bactérias *P. shigelloides*, *A. hydrophila* e *C. freundii* mais frequentemente durante o outono e a primavera, e as bactérias *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Enterobacter* sp. foram isoladas principalmente na primavera. Shama e colaboradores (2000), isolaram as bactérias *P. shigelloides*, *Aeromonas* sp., *Flavobacterium* sp., *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Vibrio* sp., *Edwardsiella tarda*, *Micrococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Yersinia ruckeri*, *Enterobacter* sp., *Pasteurella* sp. e *Salmonella* sp. colonizando lesões externas e rins de jundiás cultivados em sistema semi-intensivo de produção. Dos 13 gêneros bacterianos isolados, 11 são descritos como patogênicos para peixes.

Dal Pupo (2006), analisando a diversidade bacteriana em diferentes sistemas de cultivo de tilápia demonstrou que a diversidade de espécies foi semelhante nos três sistemas analisados, com predominância de bactérias dos gêneros *Aeromonas*, *Enterobacter* e *Pseudomonas*.

Neste trabalho, bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae foram as isoladas com maior frequência por características fenotípicas, correspondendo a 61 do total de 190 colônias identificadas. Essa família inclui alguns dos patógenos intestinais de maior importância, reconhecidos por sua elevada frequência como *Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella* e alguns tipos patogênicos de *E. coli*, bem como outras cuja frequência é reduzida, mas que podem ser responsáveis por surtos diarreicos (MURRAY et al., 1998).

Das bactérias dessa família, as pertencentes ao gênero *Enterobacter* foram as identificadas com maior frequência, totalizando 14 isolados, seguidas do gênero *Escherichia* com 11 isolados, *Hafnia* com 10 isolados, e *Salmonella* com 5 isolados, como pode ser verificado na tabela 4.

Membros do gênero *Enterobacter* têm sido reconhecidos como importantes patógenos responsáveis pela incidência significativa de infecções hospitalares. São resistentes a muitos antibióticos e rapidamente desenvolvem resistência a novos agentes. Causam doenças, particularmente, em pacientes submetidos à antibioticoterapia e procedimentos invasivos. Essa espécie habita o solo, águas, vegetais e alimentos (FERNANDES; VAZ FERNANDES; FILHO RIBEIRO, 2000).

Quanto ao gênero *Escherichia*, amostras de *E. coli* foram isoladas com maior frequência nos Rio Barigui, seguido do Iraí, o que confirma os resultados

apresentados pelo IAP (2009) que indicam que índices de qualidade microbiológica de água que se referem a características microbiológicas foram violadas nestes dois rios devido a presença deste microrganismo.

Bactérias desse gênero são normalmente encontradas habitando o intestino de animais e de humanos, e a sua presença na água e no intestino de peixes pode ser explicada pela grande descarga de esgoto doméstico “in natura” nos cursos de água onde foram identificadas. *E. coli* é um dos agentes etiológicos mais frequentemente isolados em casos de diarreia no homem e em diferentes espécies animais (HOLLAND, 1990; NATARO & KAPER, 1998). A maioria das cepas de *E. coli* presentes no trato gastrintestinal são comensais não patogênicos. O habitat de *E. coli* é o trato gastrintestinal de humanos e animais de sangue quente. Sua presença em amostras de água ou alimento é, geralmente, considerada como indicador direto ou indireto de contaminação fecal e da presença de patógenos entéricos (GELDREICH, 1966).

Quanto ao gênero *Hafnia*, a maioria dos microbiologistas lista como hábitat do gênero os mamíferos, aves, répteis, peixes, solo, água, esgoto e alimentos. No entanto, existem poucos dados sobre esse tema. Fatores relacionados ao hospedeiro e a geografia parecem influenciar sobre os nichos de distribuição de *H. alvei*. Entretanto, o trato gastrintestinal de animais, em especial de mamíferos, parece ser um hábitat comum de *Hafnia* (OKADA & GORDON, 2001).

Bactérias do gênero *Salmonella* puderam ser isoladas do rio Barigui, considerado como extremamente poluído, e do LAPEP, visto que esta piscicultura é abastecida pelas águas do Arroio Arujá, o qual tem como principal causa de poluição hídrica os efluentes urbanos gerados pelo uso residencial, comercial, de serviços e de indústrias (ROMANEL, 2010).

Registros em todo o mundo mostram a importância do gênero *Salmonella* como o maior causador de doenças bacterianas de origem alimentar no homem, o qual se intensifica mediante a ingestão de alimentos contaminados. O isolamento de *Salmonella* em águas poluídas tem sido freqüentemente relatado, entretanto, o isolamento também ocorre em águas naturais não poluídas (ARVANITIDOU et al., 1995). Bactérias desse gênero podem ser isoladas em esgoto, água de estuário e de água doce, provavelmente, contaminadas com esgotos urbanos ou fezes (MINETTE,

1986). De acordo com Linder (2002), o aumento da aquicultura e a presença de bactérias desse gênero em ambientes aquáticos, pode ser um fator de risco em potencial para a população.

Coliformes fecais encontrados em peixes demonstram a existência da poluição ambiental por dejetos humanos, pois a maioria dessas bactérias não fazem parte da microbiota normal de peixes. Bacilos entéricos incluem *E. coli*, *Klebsiella* sp., *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Serratia* sp. e *Edwardsiella* sp. (COHEN & SHUVAL, 1973).

Bactérias da família das enterobactérias são importante causa de infecções do trato urinário, de corrente sanguínea e de pneumonias em infecções hospitalares, além de várias infecções intra-abdominais. Dentre as enterobactérias, a *E. coli* é o microrganismo mais frequente em infecções urinárias, *Klebsiella* sp. e *Enterobacter* sp. são importantes causas de pneumonias e bactérias como as *Salmonellas* causam gastroenterites e infecções invasivas em alguns pacientes (PATERSON, 2006). *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Serratia* são semelhantes em suas manifestações clínicas e epidemiológicas (COSTA, 2011).

A família Aeromonadaceae foi a segunda com maior número de isolados. O maior número de isolados de *Aeromonas* sp. no LAPEP está ligado ao fato de que essa família bacteriana é amplamente distribuída em ambientes de criação de peixes e é uma das principais famílias envolvidas em surtos de doenças nessas criações, principalmente em ambientes de criação intensiva, que são mais propícios para o desenvolvimento de doenças quando não tomadas as medidas sanitárias básicas.

Como o presente estudo, outros autores também relatam a ampla distribuição de *Aeromonas* sp. em ambientes aquáticos, principalmente em água doce, peixes e outras fontes (BREMER et al., 2003; HUBER et al., 2004; ESPOSTO, 2007).

Bactérias pertencentes ao gênero *Aeromonas* são reconhecidas como agentes patogênicos oportunistas aos peixes (AUSTIN, 1980). Fazem parte da microbiota do intestino dos peixes, assim como de ambientes aquáticos. São consideradas patógenos oportunistas e responsabilizadas por surtos epizooticos repentinos, devido a condições ambientais desfavoráveis (NIETO et al., 1984). Também são encontradas em águas salobras e salgadas (PLUMB,

1984). Estão presentes em grande quantidade em águas com qualidade alterada, especialmente com baixos níveis de oxigênio e altos níveis de matéria orgânica (NEWMAN, 1993). Sendo assim, pode-se ressaltar a importância de conhecer e monitorar a microbiota intestinal de peixes, para controlar surtos de infecção e aumentar a produtividades em sistemas de criação.

Algumas cepas de *Aeromonas hydrophila* são capazes de causar doenças em outros animais e humanos, quando ingeridas na alimentação ou na água (U.S. FDA, 1999; BISWAS et al., 2002). No Brasil, bactérias do gênero *Aeromonas* têm sido descritas como patógenos emergentes de importância crescente em alimentos (BOIJINK & BRANDÃO, 2004).

A família Neisseriaceae também foi amplamente identificada neste estudo, representada unicamente pela bactéria *Chromobacterium violaceum*, sendo que todos os isolados são provenientes de amostras coletadas no LAPEP.

Chromobacterium violaceum é um grupo de microrganismos anaeróbio facultativo, móvel, bacilo gram-negativo, habita solos e águas em regiões tropicais e subtropicais. A maioria das espécies produz um pigmento violeta. É valorizado pela capacidade de produzir compostos (inibidores de crescimento, enzimas e bioplástico) de importância biotecnológica. Apesar de raramente infectar humanos, possui alta taxa de mortalidade (CHANG et al., 2007). Em relação a peixes, não foi relatado como patógeno.

Outras famílias bacterianas com grande importância tanto na piscicultura quanto na saúde humana são a Pseudomonadacea e a Burkholderiaceae. Bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* foram isoladas apenas de animais capturados no LAPEP. As *Pseudomonas* são agentes patogênicos oportunistas que se encontram naturalmente na água e nos peixes, e que provocam um estado septicêmico hemorrágico em condições de estresse e enfraquecimento dos hospedeiros. Em ambientes de criação intensiva são amplamente distribuídas.

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria ubíqua, com predileção por ambientes úmidos, sendo encontradas no solo, água e plantas. É pouco frequente como constituinte da microbiota de indivíduos saudáveis, entretanto, pacientes hospitalizados se colonizam facilmente com este microrganismo. O trato gastrointestinal é o principal sítio de colonização e reservatório dessa

bactéria, podendo ser encontrada também em outros locais úmidos do corpo (KISKA & GILLIAN, 2003). *P. aeuriginosa* também é muito difundida colonizando pacientes internados em unidades de terapia intensiva, além de também ser causadora de infecções hospitalares em geral (COSTA, 2001).

Quanto às bactérias do gênero *Burkholderia*, habitam o solo, água e superfície de plantas ou raízes (TEBALDI, 2008). *B. cepacia* apresenta três principais problemas para a comunidade: multirresistência aos agentes antimicrobianos; a transmissão de cepas epidêmicas hospitalares de pessoa para pessoa, ou através de contatos sociais; e a 'síndrome cepacia', uma pneumonia fulminante fatal, por vezes associada à septicemia, que ocorre em aproximadamente 20% dos pacientes colonizados, incluindo aqueles com doença leve anteriormente (VANDAMME et al., 2000). Faz parte de um grupo de agentes patogênicos de grande risco na fibrose cística, associado a pior prognóstico e infecção cruzada entre os doentes. É uma bactéria intrinsecamente resistente a múltiplos antibióticos, desinfetantes e anti-sépticos (CORREIA, 2008).

Outra família de grande importância que teve bactérias isoladas neste estudo é a Vibrionaceae, com um total de 4 colônias sendo que todas eram provenientes do LAPEP. Bactérias pertencentes a esta família são típicas de ambientes marinhos e estuarinos, com necessidade de NaCl (2 a 3%) para o crescimento. Como o ambiente marinho é seu nicho natural, os víbrios são facilmente isolados de peixes e crustáceos. A maioria das espécies é mesófila com tendência a proliferação em épocas mais quentes. Algumas espécies desse gênero podem causar doenças em humanos, incluindo infecções em feridas, septicemia e gastroenterites (COSTA, 2006). Dentre essas, inclui-se a espécie emergente *V. parahaemolyticus*.

De acordo com as famílias bacterianas mais frequentemente isoladas, pode-se perceber que medidas urgentes de saneamento básico necessitam ser tomadas, pois, a maioria das bactérias isoladas no presente trabalho faz parte da família Enterobacteriaceae, o que demonstra que os pontos de coleta estão recebendo descarga de esgoto doméstico em seus leitos e, nos últimos anos tem sido bem descrito que os peixes de água doce e salobra podem abrigar bactérias patogênicas a humanos, em particular os coliformes (LEUNG, HUANG & PACORBO, 1990; RAMOS & LYON, 2000), sendo que a

contaminação de peixes a partir de bactérias entéricas de origem humana ou animal pode ser responsável por diversas infecções alimentares (GELDREICH & CLARKE, 1966).

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

A transmissão de enfermidades entéricas após o consumo de alimentos a base de pescados pode estar relacionada com a ingestão de peixes contaminados no ambiente hídrico. Muitos microrganismos patogênicos são transferidos ao homem através da via oral-fecal. Microrganismos potencialmente patogênicos transmitidos dos animais para o homem tendo o peixe como veículos de transmissão incluem: *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas shigelloides*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Vibrio* sp., e *Yersinia* sp. (LINDER, 2002).

Outro agravante nessa transmissão é que essas bactérias podem carregar alguns genes de resistência aos antibióticos, o que dificulta muito o tratamento de possíveis infecções, além do que, o aumento da resistência entre as bactérias intestinais humanas é um perigo para a saúde humana, pois algumas bactérias normalmente presentes no trato intestinal do corpo humano são capazes de causar risco a vida do mesmo, além de serem capazes de transmitir essa resistência para bactérias ingeridas pelo hospedeiro, pois a microbiota normal de peixes e do ambiente aquático podem ser importantes reservatórios para os genes de resistência aos antibióticos.

No presente estudo, elevada frequência de resistência aos antibióticos foram observados para os antibióticos ampicilina, cefalotina, cefoxitina e ertapenem, enquanto que ao cefepime não houve nenhuma cepa resistente.

Os resultados obtidos demonstram que as bactérias isoladas do LAPEP e do Rio Barigui apresentam maior frequência de resistência que as isoladas de locais menos poluídos, o que está de acordo com os achados de Mc Nicol (1980), que afirma que os níveis de poluição podem influenciar a composição genética de bactérias resistentes e maior incidência de bactérias resistentes aos antibióticos foi detectada a partir de ambientes aquáticos poluídos do que em de locais menos poluídos.

Além disso, os níveis de poluição podem influenciar no número de plasmídeos presentes nas bactérias, pois bactérias provenientes de locais poluídos por produtos químicos tóxicos foram relatadas como tendo maior incidência de plasmídeos e uma maior resistência aos antimicrobianos do que aquelas obtidas em locais limpos (BAYA et al., 1986).

Outro fator que pode ter influência significativa no resultado da frequência de resistência é o produto químico ou o ambiente físico do encontro de um patógeno e um agente antimicrobiano, além do perfil das espécies bacterianas isoladas da cada local amostrado. Já no contexto de uma infecção, a sensibilidade ou a resistência de uma cepa pode ser determinada em função da localização do patógeno e da distribuição tecidual do agente bacteriano.

Quando comparados a frequência de resistência de dois pontos de coleta, os rios Barigui e Irai, percebe-se que as bactérias presentes nos peixes e na água do rio Barigui são mais resistentes que as do Rio Irai, entretanto, neste caso, o tipo de poluição lançado no rio deve ser levado em consideração. Além disso, a coleta de peixes e água do rio Irai foi feita na saída de um reservatório de água que é utilizado no abastecimento de 2,5 milhões de habitantes da Região Metropolitana de Curitiba, logo, parte-se do pressuposto de que está água tem condições sanitárias mínimas para o seu uso.

Resultados obtidos com a realização das análises estatísticas demonstraram diferença significativa em relação à ocorrência de resistência bacteriana aos antibióticos quando comparados os pontos de coleta LAPEP *versus* Rio Barigui, LAPEP *versus* Rio Irai e LAPEP *versus* Rio Pequeno levando em consideração todos os antibióticos. Houve também diferença significativa quanto a resistência aos antibióticos ampicilina, cefalotina e cefoxitina; e os antibióticos ertapenem, gentamicina e sulfametazol/trimetropim

quando comparados os resultados de resistência obtidos com bactérias isoladas do jundiá provenientes do LAPEP, do Rio Barigui e do Rio Pequeno.

Quando comparados estatisticamente os perfis de resistência obtidos com bactérias isoladas de carpas e jundiás do LAPEP, houve diferença significativa referente aos antibióticos ácido nalidíxico, cefalotina, cefoxitina e tetraciclina.

Esses resultados indicam que pode haver diferenças entre locais com diferentes níveis de poluição e ação antrópica quanto ao perfil bacteriano de resistência aos antibióticos, como já foi descrito por alguns autores, entretanto alguns fatores devem ser levados em consideração, como o perfil das espécies bacterianas isoladas e o tipo de poluição lançada no ambiente natural.

Jacoby (2008), realizando um estudo em um hospital do Rio Grande do Sul sobre a estimativa da frequência de multirresistência em *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp., *Serratia* sp., *Proteus* sp., *Acinetobacter* sp., *Burkholderia cepacia* e *Stenotrophomonas maltophilia*, principais bactérias relacionadas à presença de resistência aos antibióticos em centros de terapia intensiva, através da associação entre o consumo de antimicrobianos e a prevalência de microrganismos multirresistentes, demonstrou correlação positiva entre o consumo de antimicrobianos na instituição em estudo e a prevalência de microrganismos multirresistentes no centro de terapia intensiva.

Um estudo de Grimes e colaboradores (1988) demonstrou que bactérias isoladas de ambientes contaminados possuem um maior número de plasmídeos que as de áreas não poluídas. Sengelov et al. (2003), informou que o número de microrganismos resistentes a tetraciclina correlaciona-se positivamente com a disseminação de esturme de suínos que continham tetraciclina, já Salyers e Shoemaker (1995) relataram que a transferência de genes de resistência a tetraciclina utilizando transposons conjugativos foi facilitada pela presença deste antibiótico entre grupos de *Bacteroides*.

Devido ao fato de o uso de antibióticos em animais pode resultar em bactérias resistentes (HOLMBERG, 1974) várias tentativas foram feitas para comparar os padrões de resistência aos antibióticos em coliformes fecais com as fontes dos isolados. Kruperman (1983) mostrou que o MAR de *E. coli* isolados de animais selvagens era geralmente menor que os isolados de

humanos e aves. Da mesma forma, Kaspar et al. (1990) demonstraram que o índice de MAR de *E. coli* isoladas de zonas rurais era menor que os das isoladas de áreas urbanas.

O perfil de resistência aos antibióticos de *Streptococos* e *Enterococos* fecais também foram usados para tentar identificar fontes de poluição por Kibbey et al. (1978) e Knudtson e Hartman (1993).

Além disso, estudos como o de Gaynes (1997) demonstram uma diminuição da resistência com o uso restritivo de aminoglicosídeos como a gentamicina e a tobramicina, o que vem ao encontro de uma das proposições deste trabalho de que o uso de antibióticos pela população humana pode influenciar no percentual de isolados bacterianos resistentes no ambiente.

Entretanto, são necessários mais estudos para comprovar esses resultados, pois estudos como o de Niemi e colaboradores (1983) não conseguiram demonstrar evidente ligação entre a fonte de coleta da amostra e o nível de contaminação. No estudo destes autores a resistência das bactérias aos antibióticos variou de um ponto para outro, mas não foi possível a evidente ligação entre fonte e nível de contaminação, como ocorre no presente trabalho.

Quando analisado o perfil de resistência aos antibióticos entre as famílias bacterianas isoladas, percebe-se que as famílias que apresentaram maior frequência de resistência foram a Pleisiomonadaceae, que tem como representante principal *Pleisiomonas shigelloides* e a que apresentou menor frequência de resistência foi a Aeromonadaceae e a Enterobacteriaceae, que tem como representantes as principais bactérias patogênicas ao homem e aos peixes, tais como *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Aeromonas sp.*, entre outras. Entretanto, deve-se ter cuidado ao se analisar estes resultados, pois o número de bactérias pertencentes à família Pleisiomonadaceae foi baixa, o que pode ter mascarado os resultados obtidos.

Apesar de toda a problemática ao redor da resistência aos antibióticos e também de esses microrganismos terem sido isolados de locais contaminados com esgoto doméstico, bactérias de grande importância na saúde animal e humana ainda apresentam baixo perfil de resistência quando comparadas com bactérias de menor importância para a saúde pública.

Entretanto, este perfil de resistência deve ser constantemente monitorado, pois a emergente resistência aos antibióticos em

Enterobacteriaceae é um problema significativo que requer atenção imediata, pois a resistência relacionada com a produção β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) é um problema no tratamento de infecções causadas por bactérias pertencentes a família Enterobacteriaceae, entretanto, outros mecanismos de resistência também estão surgindo, levando à resistência a múltiplas drogas. Cefalosporinas de 3ª geração foram desenvolvidas para superar este problema, porém estudos demonstram que, logo após a introdução destes antimicrobianos no tratamento de enfermidades, algumas bactérias como *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* sp. conseguiram desenvolver mecanismos para sobreviver, e a cada dia que passa maiores índices de resistência a este agente estão sendo notificados em bactérias pertencentes a família Enterobacteriaceae em todo o mundo (PATERSON, 2006).

Genes que codificam resistência a ESBLs são frequentemente encontrados nos mesmos plasmídeos que contêm genes que codificam a resistência aos aminoglicosídeos e sulfonamidas, e muitas espécies de Enterobacteriaceae possuem alterações que conferem alto nível de resistência a quinolonas. Isto significa que Enterobacteriaceae produtora de ESBL provenientes de hospitais são comumente resistentes a múltiplas drogas, o que representa um desafio para o tratamento de infecções nosocomiais, especialmente em pacientes criticamente enfermos (KOLLEF, 1999).

Quanto ao perfil de MAR obtidos no presente estudo, foi possível observar que os maiores índices foram encontrados nas bactérias isoladas do LAPEP, um local de criação intensiva, como pode ser observado na tabela 3.

De acordo com o Comitê de segurança microbiológica para alimentos de Londres (1999), isso pode ser explicado pelo fato de que os peixes geralmente contêm agentes antimicrobianos, os quais são adicionados a ração para tratar e/ou prevenir doenças. Além disso, resíduos de agentes antimicrobianos, bem como bactérias resistentes podem entrar nos viveiros através de esterco de animais utilizado na alimentação de peixes e na adubação da água. Outro fator que pode contribuir para a pressão seletiva a favor de bactérias resistentes neste tipo de ambiente é o excesso de alimento nos viveiros e a alta densidade de animais.

Analisando todos os resultados de MAR obtidos, observa-se que a grande maioria desses índices é superior a 0,2, o que é preocupante, pois, a presença de grande número de bactérias multirresistentes no ambiente aquático geram implicações ecológicas e de saúde pública e enfatiza a necessidade de novos estudos, principalmente em relação aos determinantes de resistência em diferentes espécies bacterianas, assim como sobre a possibilidade de transferência de genes de resistência a patógenos humanos mediante o consumo de pescado.

Em um trabalho de Dal Pupo (2006), o perfil de resistência aos antimicrobianos de amostras oriundas de três diferentes sistemas de cultivo foi testado. Dentre as 43 espécies bacterianas identificadas, 95% apresentaram índice MAR igual ou acima de 0,2, o que caracteriza múltipla resistência. Os antimicrobianos eritromicina, ampicilina e cefuroxima foram, respectivamente, os que apresentaram maiores números de espécies resistentes nos sistemas analisados.

Dados semelhantes foram obtidos por Miranda & Zemelman (2002), avaliando o perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias oriundas de fazendas de salmão no Chile. No mesmo trabalho, os autores observaram menores números de amostras resistentes para cloranfenicol e fluorfenicol.

Considerando como critério de múltipla resistência $MAR \geq 0,2$, conclui-se que a microbiota isolada nos sistemas de cultivo de tilápia é tipicamente multirresistente. Portanto, sugere-se que densidades populacionais elevadas podem favorecer a disseminação de genes de resistência a antibióticos entre bactérias presentes nos sistemas de cultivo analisados (DAL PUPO, 2006).

Há relatos de que a múltipla resistência aos antimicrobianos é elevada em ambientes onde há utilização constante de drogas e tem sido observada em bactérias relacionadas ao ambiente aquático (KRUMPERMAN, 1983; MIRANDA & ZEMELMAN, 2002; HATHA et al., 2005).

Logo, a interpretação lógica dos resultados obtidos de altos índices de MAR é de que a grande maioria das cepas bacterianas isoladas de amostras de água e conteúdo intestinal de peixes oriundos de locais com diferentes níveis de poluição são originadas a partir de fontes de alto risco de contaminação por fezes de aves, suínos, bovinos e humanos, onde os antibióticos são amplamente utilizados no tratamento e prevenção de

enfermidades, pois, de acordo com Lee et al. (1993); Ogan e Nwiika, (1993); e DePaola et al. (1995), frequências elevadas de resistência aos antibióticos têm sido relatadas em bactérias isoladas de áreas onde os antibióticos foram amplamente utilizados pelos seres humanos, e em ambientes terrestres e aquáticos sujeitos a produção intensiva de animais.

Além disso, pressões seletivas locais podem influenciar na resistência aos antibióticos. Chang e Bolton (1987) constataram que uma maior porcentagem de isolados asiáticos de *A. hydrophila* foi resistente a tetraciclina e rifampicina, que isolados australianos.

Entre os fatores de risco para o desenvolvimento de resistência aos antibióticos, estudos têm estabelecido o importante papel que o uso abusivo de antimicrobianos representa para a ocorrência de microrganismos multirresistentes no ambiente hospitalar (WHITE et al., 2000; GAYNES, 1997). O extenso uso de antimicrobianos no ambiente hospitalar pode causar graves consequências para os pacientes, para o ambiente e para a instituição (EICKOFF, 1998), pois os hospitais são considerados pontos de disseminação de genes de resistência a antibióticos para o ambiente natural.

Meta análise de nove estudos de infecções de corrente sanguínea por *Enterococcus* resistentes a vancomicina, encontrou taxa de mortalidade de 30% maior em comparação com infecções causadas por *Enterococcus* sp. sensíveis à vancomicina (SALGADO & FARR, 2003). Resultados semelhantes foram relatados para infecções causadas por organismos gram-negativos multirresistentes incluindo *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Enterobacter* sp. e organismos produtores de beta-lactamases de espectro estendido (COSGROVE, 2006).

Além disso, estima-se que mais de 70% das bactérias encontradas em ambientes hospitalares nos Estados Unidos seja resistente a pelo menos um antibiótico (MURTHY, 2001). Pessoas infectadas com microrganismos multirresistentes apresentam maior permanência no internamento hospitalar e requerem tratamento com fármacos de segunda ou terceira escolha, os quais podem ser mais caros e mais tóxicos (CDC, 2007).

Entretanto, resultados obtidos no presente estudo foram deduzidos por dados genéricos de poluição dos pontos de coleta, de acordo com um estudo de IAP (2009), sendo assim, são necessários estudos com maior detalhamento

do níveis de poluição da água, bem como da composição destes poluentes para estabelecer uma relação concreta entre nível de ação antrópica e resistência bacteriana, de maneira definitiva.

Clark et al. (1973) e Angulo e Griffin (2000), consideram o potencial de transporte de bactérias resistentes aos antibióticos como um mecanismo alternativo, responsável pela disseminação de determinantes de resistência aos antibióticos do meio aquático para o terrestre. A presença de antibióticos no ambiente aquático pode resultar no aparecimento de resistência entre agentes humanos que fazem parte da sua microbiota. Por exemplo, o *V. cholerae*, causador da epidemia de cólera na América Latina que ocorreu em 1992, parece ter adquirido resistência aos antibióticos ao entrar em contato com bactérias resistentes selecionadas pelo elevado uso de antibióticos na produção de camarão no Equador (WEBER et al., 1994; ANGULO, 2000).

Analisando os resultados obtidos com o teste de resistência aos antibióticos, percebe-se a alta frequência de resistência apresentada pelas bactérias. De acordo com Kapli (2005), vários fatores contribuem para o surgimento de genes de resistência aos antibióticos, tais como: (i) falta de educação, principalmente das populações mais pobres; (ii) infecções hospitalares; (iii) utilização dos antibióticos na agricultura e na aquicultura; (iv) fatores ambientais; (v) utilização de antibióticos em produtos de limpeza de uso doméstico.

O uso abusivo destas drogas está associado a diversos problemas, como a presença de resíduos ilegais na carne e transmissão de bactérias resistentes para o meio ambiente, animais e para o próprio homem, sendo risco potencial para a saúde pública. Sendo assim, percebe-se que maior atenção deve ser dada pelas autoridades e pela população em geral a disseminação dos genes de resistência aos antibióticos entre bactérias ambientais, pois essas bactérias podem chegar aos humanos direta ou indiretamente, podendo causar sérias infecções, e, conseqüentemente, trazer sérios problemas para o sistema de saúde pública, pois podem apresentar genes de resistência aos antibióticos o que pode dificultar o tratamento e levar ao óbito.

Além disso, para dar suporte ao avanço no setor aquícola, que está em amplo crescimento, são necessários cada vez mais estudos de manejo nutricional e nessa área, em particular, destaca-se o conhecimento da

microbiota intestinal, cujo estado da arte ainda se encontra muito superficial, quando comparado a de outras espécies, como vertebrados terrestres (CAHILL, 1990).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Com a realização das coletas foi possível a captura de três diferentes espécies de peixes para a avaliação da composição da microbiota intestinal, bem como a comparação do perfil de resistência aos antibióticos das bactérias.
- Quanto ao perfil bacteriano encontrado no intestino de peixes de água doce, pode-se observar que a maior frequência de cepas bacterianas identificadas pertence às famílias Enterobacteriaceae e Aeromonadaceae;
- Comparando-se o perfil bacteriano da água de cultivo e do intestino dos peixes, percebe-se que 23% das colônias bacterianas puderam ser encontradas em ambos os locais, sendo que todas elas são representativas das famílias identificadas com maior frequência;
- Quanto à comparação da eficiência de técnicas fenotípicas e genotípicas para a identificação bacteriana, percebe-se que as técnicas moleculares apresentam resultados mais rápidos e confiáveis, além de não necessitar o cultivo bacteriano, sendo mais indicadas em caso de amostras ambientais;
- Quanto ao perfil de resistência aos antibióticos, percebe-se que a ampicilina foi o antibiótico que apresentou maior número de cepas resistentes, enquanto o cefepime não apresentou resistência a nenhuma amostra. Quando se tratando das famílias bacterianas analisadas, a família Pleisiomonadaceae apresentou maior resistência, enquanto que a Aeromonadaceae foi a que apresentou menor resistência;
- Quanto a pressão de seleção de microrganismos resistentes aos antibióticos, os resultados obtidos apontam para o fato de que locais mais poluídos tendem a apresentar bactérias mais resistentes, além de que o tipo de poluição também parece ter influência no perfil de resistência bacteriana. Novos estudos com monitoramento de longo prazo da poluição dos pontos de coleta se fazem necessários para a confirmação dessa hipótese.
- Serão feitas bibliotecas de clones de DNA para permitir a identificação de bactérias que tiveram o seu DNA isolado direto do conteúdo intestinal

com a finalidade da determinação da diversidade microbiano existente no intestino de peixes;

- Estudos como esse são necessários para a determinação da diversidade microbiana existente no intestino de peixes, que ainda é pouco conhecida, para fins terapêuticos e de produção, além da determinação do perfil de resistência destas bactérias, pois são potenciais riscos para a saúde animal e humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGERSBORG, A., REIDUN, D., MARTINEZ, I. Sample preparation and DNA extraction procedures for polymerase chain reaction identification of *Listeria monocytogenes* in sea foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.35, p. 275-280, 1997.

ÁGUIARO, T.; CARAMSCHI, E.P. Trophic guilds in fish assemblages in three coastal lagoons of Rio de Janeiro state (Brazil). **Verhandlungen des Internationale Verein Limnologie**, v.26, p.166-169, 1998.

ALLI ABADI, F.S.; LEES, P. Antibiotic treatment for animals: effect on bacterial population and dosage regimen optimization. **Journal of Antimicrobial Agents**, v.14, p.307-313, 2000.

AMORIM, D.M.R et al. Inducible clindamycin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v.52, n.1, p.49-51, 2009.

ANGULO, F.J. Antimicrobial agents in aquaculture: potential impact on health. **APUA Newsletter**, v.18, p. 1–6, 2000.

ANGULO, F.J.; GRIFFIN, P.M. Changes in antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Emerging Infectious Diseases**, v.6, p. 436–438, 2000.

Anon report on microbial resistance in relation to food safety. Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food. London. 1999. HMSO.

ARVANITIDOU, M. et al. The occurrence of *Salmonella*, *Campylobacter* and *Yersinia* spp. in river and lake waters. **Microbiological Research**, v.150, p.153-158, 1995.

AUBERT, G. et al. Impact of restricting fluoroquinolone prescription on bacterial resistance in an intensive care unit. **Journal of Hospital Infection**, v.59, n.2, p. 83-89, 2005.

AUSTIN, B. Human disease associated with fish culture. **Journal of Bacteriology**, p.190-195, 1980.

AUSTIN, B. The bacterial microflora of fish. **The Scientific World Journal**, v. 2, p. 558-572, 2002.

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

BATT, A.L; SNOW, D.D; AGA, D.S. Occurrence of sulfonamide antimicrobials in private water wells in Washington County, Idaho, USA. **Chemosphere**, v.64, n.11, p.1963–1971, 2006.

BAUER, A.; PERRY, D.; KIRBY, W. Drug usage and antibiotic susceptibility of staphylococci. **The Journal of American Medical Association**, v.173, p.475-480, 1960.

BAYA,A.M. Coincident plasmid and antimicrobial resistance in marine bacteria isolated from polluted and unpolluted Atlantic ocean samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v.51, n.6, p.1285-1292, 1986.

BERQUÓ, L. S, et al. Use of antimicrobial drugs in an urban population. **Revista de Saúde Pública**, v.38, n.2, p.239-246, 2004.

BISWAS,K. et al. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). **Current Science**, v.28, p. 1336-1345, 2002.

BOIJINK, C.L.; BRANDÃO, D.A. Avaliação da inoculação de suspensões bacterianas de *Aeromonas hydrophila* em juvenis de jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Biodiversidade Pampeana**, v.2, p. 3-8, 2004.

BOOTGER, E.C. Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. **Federation of European Microbiological Societies: Microbiology Letters**, v.65, p.171-176, 1989.

BREMER P.J.et al. *Aeromonas* spp. in seafood. New Zealand Institute for Crop & Food Research, Christchurch. 6p., 2003.

BUD, R. Antibiotics: the epitome of a wonder drug. **Brithis Medical Journal**, v. 334, p. 6, 2007.

BUTAYE, P.; CLOECKAERT, A.; SCHWARZ, S. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.22, p.205-210, 2003.

CABELLO, F.C. Antibiotics and aquaculture: an analysis of their potential impact upon the environment, human and animal health in Chile. **Fundacion Terram - Analisis de Politicas Publicas** n. 17, p. 1–16, 2003.

CAHILL, M. M. Bacterial flora of fishes: a review. **Microbial Ecology**, v. 19, p. 21-41, 1990

CASSEL, G. H.; MEKALANOS, J. Development of antimicrobial agents in the era of new and reemerging infectious diseases and increasing antibiotic resistance. **The Journal of American Medical Association**, v. 285, p. 601–605, 2001.

CASTAGNOLLI, N.; CYRINO, J.E.P. **Piscicultura nos trópicos**. Editora Manole LTDA, São Paulo: 1986, 152p.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, CDC. Campaign to prevent antimicrobial resistance in healthcare settings. Why a campaign. CDC, 2007 ([http://www.cdc.gov/drugresistance/healthcareproblem,htm](http://www.cdc.gov/drugresistance/healthcareproblem.htm)).

CHANG, B.J.; BOLTON, S.M. Plasmids and resistance to antimicrobial agents in *Aeromonas sobria* and *Aeromonas hydrophila* clinical isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.31, p. 1281-1282, 1973.

CHANG, C.Y., et al. *Chromobacterium violaceum* infection in Taiwan: a case report and literature review. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v.40, p.272-275, 2007.

CLARK, G.M.; KAUFMANN, A.F.; GANGAROSA, E.J. Epidemiology of an international outbreak of *Salmonella agona*. **Lancet**, v. 2, p.490–493, 1973

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standards M2-A9**. Ninth ed, v.26, n.1, USA, 2006.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement M100-S20**. v.30, n.1, USA, 2010.

COHEN, J; SHUVAL, H.I. Coliform, fecal coliform and fecal streptococci as indicators of water pollution. **Water, Air and Soil Pollution**, v.2, n.1, p. 85-95, 1973.

CONLY, J. Antimicrobial resistance in Canada. **Canadian Medical Association Journal**, v.167, n.8, p.885-891, 2002.

CORREIA, S. et al. Infecção respiratória por bactérias do complexo *Burkholderia cepacia*: Evolução clínica em doentes com fibrose quística. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v. 14, n.1, p.5-26, 2008.

COSGROVE, S.E. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs. **Clinical and Infectious Diseases.**, v.42, p.S82-S89, 2006.

COSTA, F.I.D. **Avaliação do impacto de uma intervenção restritiva do emprego de antimicrobianos para o controle de infecção hospitalar em pacientes internados em unidades de terapia intensiva.** Porto Alegre – Rio Grande do Sul, 2001. 84p. Tese (Doutorado em Clínica Médica e Ciências Médicas) – Curso de Pós-graduação em medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.

COSTA, R.A. **Pesquisa de *Vibrio* no cultivo do Camarão Marinho *Litopenaeus vannamei* no estado do Ceará.** Fortaleza. 2006.

COSTANZO, S.D.; MURBY, J.; BATES, J. Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 51, p.218–223, 2005.

CRUZ, L.M. et al. 16S ribossomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa spp.*) and pineapple (*Ananas comosus* (L) Merrill). **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.5, p. 2375-2379, 2001.

DALPUPO, H.D. **Diversidade da microbiota gram-negativa de cultivo de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).** Lavras-MG, 2006, 42p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Lavras, 2006.

DePAOLA, A. et al. Effect of oxytetracycline-medicated feed on antibiotic resistance of Gram-negative bacteria in catfish ponds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 2335-2340, 1995.

DEPIZZOL, F. **Avaliação da resistência a antibióticos em isolados de *Escherichia coli* provenientes de esgoto hospitalar e sanitário.** Vitória – ES, 2006. 145p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo.

DOBELL, C. Anton Von Leewenhoek and big “Little Animals”. **Harcourt Brace and Company.** New York, NY, USA, 1932.

EICKOFF, T.C. Antibiotics and nosocomial infections. In: Bennett JV BP, editor. **Hospital Infections**, Philadelphia: Lippincott –Raven; p.201-214, 1998.

EMBLEY, T.M. The linear PCR reaction: a simple and robust method for sequencing amplified rRNA genes. **Letters in Applied Microbiology**, v.13, p.171-174, 1991.

ESPOSTO, E.M. et al. Enteropatógenos bacterianos em peixes criados em uma estação de reciclagem de nutrientes e no ecossistema relacionado. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.4, p.144-148, 2007.

FERNANDES, A.T.; VAZ FERNANDES, M.O.; FILHO RIBEIRO, N. Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde. São Paulo: Atheneu; 2000.

FJELLHEIM, A.J. et al. Vibrionaceae dominates the microflora antagonistic towards *Listonella anguillarum* in the intestine of cultured Atlantic cod (*Gadus marhua* L.) larvae. **Aquaculture**, v.269, p.98-106, 2007.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. Editora Atheneu, Rio de Janeiro, 2002.

GAYNES, R.M.D. The impact of antimicrobial use on the emergence of antimicrobial-resistant bacteria in hospital. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.11, n.4, p.757-765, 1997.

GELDREICH, E.E.; CLARKE, N.A.. Bacterial pollution indicators in the intestinal tract of freshwater fish. **Applied Microbiology**, v. 14, p. 429-437, 1966.

GIRAUD, E. et al. Survey of antibiotic resistance in an integrated marine aquaculture system under oxolinic acid treatment. **Federation of European Microbiological Societies: Microbiology Ecology**, v. 55, p. 439-448. 2006.

GOOSSENS, H. et al. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. **The Lancet**, v. 365, p. 579–587, 2005.

GOOSSENS, H. et al.. National campaigns to improve antibiotic use. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 62, p. 373–379, 2006.

GRIGORYAN, L. et al.. Self-medication with antimicrobial drugs in Europe,” **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 452–459, 2006.

GRIMES, C.B. et al. The reproductive biology of tilefish, *Lopholatilus chamaeleoticeps* Good and Been, from the United States Mid-Atlantic Bight, and the effects of fishing on the breeding system. **Fish Bull**, v.88, p.745-762, 1988.

GUEDES, D.S. **Contribuição ao estudo da sistemática e alimentação de jundiás (*Rhamdia spp*) na região central do Rio Grande do Sul (Pisces, Pimelodidae)**. Santa Maria – RS, 1980. 99p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, 1980.

GURLER, V.; MAYALI, B.C. Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v.51, p.3-16, 2001.

HARBARTH,S. et al. Parallel analysis of individual and aggregated data on antibiotic exposure and resistance in gram-negative bacilli. **Clinical Infectious Diseases**, v.33, n.9, p.1462-1468, 2001.

HARTMANN, et al. Primary DNA damage but not mutagenicity correlates with ciprofloxacin concentrations in German hospital waste waters. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 36, p. 115–119, 1999.

HATHA, M. et al. Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish. **International Journal of Food Microbiology**, v. 98, p. 131-134, 2005.

HEINITZ, M.L. et al. Incidence of *Salmonella* in fish and seafood. **Journal of Food Protection** v.63, p.579–592, 2000.

HEUER, O.E. et al. Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. **Clinical Infectious Diseases**, n. 49, p.1248 – 1253, 2009.

HIRAISHI, A. Respiratory quinone profiles as tools for identifying different bacterial population in activated sludge. **The Journal of General Applied Microbiology**, v.34, p.39-56, 1998.

HOLAND, R.E. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v.3, p.345-375, 1990.

HOLMBERG, S. D. et al. Drug-resistant salmonella from animals fed antimicrobials. **The New England Journal of Medicine**, v. 311, p.617–622, 1984

HOVDA, M.B. et al. Molecular characterization of the intestinal microbiota of farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**, v. 272, p.581-588, 2007.

HUBER, I et al. Phylogenetic analysis and *in situ* identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **Journal of Applied Microbiology**. v.96, n.1, p.117-132, 2004.

IAP. **Monitoramento da qualidade das águas dos rios da Bacia do Alto Iguaçu, na região metropolitana de Curitiba, no período de 2005 a 2009**. Instituto Ambiental do Paraná; Curitiba: IAP, 2009. P.114.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Antimicrobial Resistance: Issues and Options**. Washington DC: National Academic Press, 1998.

IVERSEN, A. et al. Evidence for transmission between humans and the environment of a nosocomial strain of *Enterococcus faecium*. **Environmental Microbiology**, v.6, n.1, p.55–59, 2004.

JACOBY, T.S. **Associação entre consumo de antimicrobianos e multiresistência bacteriana em centro de terapia intensiva de hospital universitário brasileiro, 2004-2006**. Porto Alegre – RS, 2008, 108p. Dissertação (Mestrado em Medicina) – Curso de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

KAPIL, A. The challenge of antibiotic resistance: Need to contemplate. **Indian Journal of Medical Research**., n.121, p. 83-91, 2005.

KASPAR, C.W. et al. Antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify sources of fecal contamination in water. **Canadian Journal of Microbiology**, v.36, n. 12, p.891–894, 1990.

KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. **Ecological Indicators**, v.8, n.1, p.1–13, 2008.

KIBBEY, H.J.; HAGEDORN, C.; MCCOY, E.L. Use of fecal streptococci as indicators of pollution in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.35, n.4, p.711–717, 1978.

KIM, D.H. et al. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Applied Microbiology**, v. 102, p.1654-1664, 2007.

KIM, S.H. et al. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from farm environments and retail products in Oklahoma. **Journal of Food Protection**, v.68, n.10, p.2022–2029, 2005.

KISKA, D.L; GILLIAN, P.H. *Pseudomonas*. In: **Manual of Clinical microbiology**. MURRAY, P.R. et al. 8 ed. Manual of clinical microbiology. American Society for Clinical Microbiology, Washington, D.C., 2003.

KLEVENS, R.M. et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. **The Journal of American Medical Association**, v. 298, p.1763–1771, 2007.

KNUDTSON, L. M.; P. A. HARTMAN. Antibiotic resistance among enterococcal isolates from environmental and clinical sources. **Journal of Food Protection**, v. 56, p.489–492, 1993.

KOIKE, S. et al. Monitoring and source tracking of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater adjacent to swine production facilities over a 3-year period. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 73, n. 15, p. 4913-4823. 2007.

KOLLEF, M. H., et al. Inadequate antimicrobial treatment of infections: a risk factor for hospital mortality among critically ill patients. **Chest**, v.115, p. 462-474, 1999.

KOLPIN, D., et al. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: a national reconnaissance. **Environmental Science and Technology**, v.36, 1202–1211, 2001.

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

KÜMMERER, K. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources-a review. **Chemosphere**, v. 45, p. 957–969, 2001.

KÜMMERER, K. Significance of antibiotics in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.52, p. 5–7, 2003.

KÜMMERER, K.; HENNINGER, A. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluents. **Clinical Microbiology and Infection**, v.9, p.1203-1214 , 2003.

KÜMMERER, K. Resistance in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.54, p.311-320, 2004.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. **Chemosphere**, v. 75, p. 417–434, 2009.

LANE, D. J. et al. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, n. 20, p. 6955-6959, 1985.

LEE, C.; LANGLOIS, B.E.; DAWSON, K.A. Detection of tetracycline resistance determinants in pig isolates from three herds with different histories of antimicrobial agent exposure. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.1467-1472, 1993.

LEUNG, C., HUANG, Y.; PANCORBO, O. Bacterial flora associated with a Nigerian freshwater fish culture. **Journal of Aquaculture in the Tropics**, v.5, p. 87-90, 1990

LIMA, R.M.S. et al. Resistência a antimicrobianos de bactérias oriundas de ambiente de criação de filés de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n.1, 2006.

LINDER, C.E. **Salmonella spp. em sistema intensivo de criação de peixes tropicais de água doce**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Estadual Paulista, 2002.

LIU, Y. et al. Effect of intraperitoneal injection of immunostimulatory substances on allochthonous gut microbiota of Atlantic salmon *Salmon salar* determined using denaturing gradient gel electrophoresis. **Aquaculture Research**, v.39, p.635-646, 2008.

LIVERMORE, D.M.; WINSTANLEY, T.V.; SHANNON, K.P. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.48, p.87-102, 2001.

LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogeny of bacteria beyond the 16S rRNA standard. **The American Society of Microbiology News**, v.65, n.11, p. 752-757, 1999.

MACFARLAND, L. V. Normal flora: diversity and functions. **Microbial Ecology in Health and Disease**, vol. 12, p. 193-207. 2000.

Mc NICOL, L.A., et al. Isolation of drug-resistant *Aeromonas hydrophila* from aquatic environments. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.17, p.477-483, 1980.

Mc NULTY C. A. M.; FRANCIS, N.A. Optimizing antibiotic prescribing in primary care settings in the UK: findings of a BSAC multi-disciplinary workshop. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 11, p. 2278–2284, 2010.

MEDLIN, L. et al. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. **Gene**, v.71, p.491-499, 1988.

MESCHIATTI, A.J. Alimentação da comunidade de peixes de uma lagoa marginal do rio Mogi-Guaçu, SP. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v.7, p.115-137, 1995.

MEURER, S., ZANIBONI FILHO, E. Hábito alimentar do jundiá *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae), na região do alto rio Uruguai. In: XII ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, São Paulo, SP. Anais, São Paulo: SBI, 1997. 420 p., 1997.

MINETTE, H.P. Salmonellosis in the marine environment. A review and commentary. **Internacional Journal of Zoonosis**, v.13, p.71-75, 1986.

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

MOLINARI, L.M., et al. Bacterial microflora in the gastrointestinal tract of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, cultured in a semi-intensive system. **Acta Scientiarum Biological Sciences Maringa**, v. 25, p. 267 – 271, 2003.

MÖLSTAD, S., et al. Antibiotic prescription rates vary markedly between 13 European countries. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 34, p. 366–371, 2002.

MURRAY, P.R. et al. Manual of Clinical Microbiology. 6th ed., American Society for Microbiology, Washington, DC, 1995.

MURRAY, P.R. et al. Medical microbiology. 3 ed. Mosby-year Book, St Louis, Missouri, 1998. 719p.

MURTHY, R. Implementation of strategies to control antimicrobial resistance. **CHEST**, v.119, p. S405-S411, 2001.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, p. 142-201, 1998.

NAVARRETE, P. et al. Molecular analysis of intestinal microbiota of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Federation of European Microbiological Societies: Microbiology Ecology**, v.71, p.148-156, 2010.

NAYAK, S.K. Role of gastrointestinal microbiota in fish. **Aquaculture Research**, v.41, p.1553-1573, 2010.

NEWMAN, S.G. Bacterial vaccines for fish. **Annual Review of Fish Diseases**, v.3, p.143- 185, 1993.

NIEMI, M; SIBAKOV, M.; NIEMELA, S. Antibiotic resistance among different species of fecal coliforms isolated from water sample. **Applied and Environmental Microbiology**, v.45, n.1, p.79-83, 1983.

NIETO, T.P., et al. Composition between the bacterial flora associated with fingerling rainbow trout cultured in two different hatcheries in the north west of Spain. **Aquaculture**, v.42, p.193-206, 1984.

NUBEL, U. et al. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 5636-5643, 1996.

OGAN, M.T.; NWIKA, D.E. Studies on the ecology of aquatic bacteria of the Lower Niger Delta: multiple antibiotic resistance among the standard plate count organisms. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 74, p.595-602, 1993.

OKADA, S.; GORDON, D.M. Host and geographical factors influence the thermal niche of enteric bacteria isolated from native Australian mammals. **Molecular Ecology**, v.10, p. 2499-2513, 2001.

OLIVE, D.M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.6, p.1661-1669, 1999.

OHLSSEN, K. et al. Effects of sub inhibitory concentrations of antibiotics on alpha-toxin (hla) gene expression of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 2817-2823, 1998.

OLSEN, G.J.; LANE, D.J.; GIOVANNONI, S.J.; PACE, N.R. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. **Annual Reviews of Microbiology**, v.40, p.337-365, 1986.

PATERSON, D.L. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. **American Journal of Infection Control**, v.34, p.S20-S28, 2006.

PEDROSO, A. et al. Variabilidade espacial da comunidade bacteriana intestinal de suínos suplementados com antibióticos ou extratos herbais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 4, p.1225-1233, 2005

PEREIRA, C.S. et al. *Vibrio spp.* isolados de mamíferos marinhos capturados na região litorânea do sudeste ao sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, p.81-83, 2007.

PISA, G. **Identificação Molecular de Bactérias de Solo Cultivado de Campo Belo do Sul (SC) Capazes de Nodular o Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica), Universidade Federal do Paraná; 2006.

PLUMB, J.A. Relationship of water quality and infectious diseases in cultured channel catfish. **Fish, Pathogens and Environment in European**, p. 290-303, 1981.

QUEROL, M.V.M. Ocorrência de carpa húngara, *Cyprinus carpio* (LINNAEUS, 1758), e disseminação parasitária, no Arroio Felizardo, Bacia do Médio Rio Uruguai, RS, Brasil. **Biodiversidade Pampeana**, v.3, p.21-23, 2005.

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

RASTALL, R.A. Bacteria in the gut: friends and foes and how to alter the balance. **Journal of Nutrition**, v.134, p. S2022-S2026, 2004.

RINGØ, E. et al. Characterisation of the microbiota associated with intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). The effect of fish meal, standard soybean meal and a bioprocessed soybean meal. **Aquaculture**, v.261, p.829-841, 2006.

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

RODRÍGUEZ, C. et al. Lettuce for human consumption collected in Costa Rica contains complex communities of culturable oxytetracycline-and gentamicin-resistant bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n. 9, p.5870–5876, 2006.

ROMANEL, M.C.T.S Zoneamento ambiental da bacia hidrográfica do Arroio Arujá em São José dos Pinhais – PR. **Revista de Divulgação Científica e Cultural do Isulpar**, v.1, p. 132-138, 2010.

SABINO, J.; CASTRO, R.M.C. Alimentação, período de atividade e distribuição espacial dos peixes de um riacho da Floresta Atlântica (sudeste do Brasil). **Revista Brasileira de Biologia**, v.50, p. 23-36, 1990.

SAKATA, T.; OKABAYASHI, J.; KAKIMOTO, D. Variations in the intestinal microflora of tilapia reared in fresh and sea water. **Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries**, v.46, p.313-317, 1980.

SALGADO, C.D.; FARR, B.M. Outcomes associated with vancomycin-resistant enterococci: a meta-analysis. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.24, n.9, p.690-698, 2003.

SALYERS, A.A.; SHOEMAKER, N.B. Conjugative transposons: the force behind the spread of antibiotic resistance genes among *Bacteroides* clinical isolates. **Anaerobe**, v.1, p.143-150, 1995.

SALYERS, A.A. et al. Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrable gene transfer elements. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 4, p. 579-590, 1995.

SANTOS, S.A.M. **Tolerância à vancomicina em *Enterococcus faecalis*: papel de proteínas hipotéticas**. 2009. Dissertação (Mestrado em Genética Molecular e Biomedicina) – Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Lisboa, 2009.

SCHJØRRING, S.; KROGFELT, K.A. Assessment of bacterial antibiotic resistance transfer in the gut. **International Journal of Microbiology**, v. 2011, p.1-10, 2011.

SEGAL-MAURER, S. et al. Current perspectives on multidrug-resistant bacteria. **Epidemiology and Control Infectious Disease Clinical North America**, v.10, n.4, p.939-957, 1996.

SENGELOV, G et al. Bacterial antibiotic resistance level in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. **Environment International**, v.28, p.587-595, 2003.

SHAMA, S., et al. Ocorrência de bactérias com potencial patogênico nos rins e lesões externas de jundiás (*Rhamdia quelen*) cultivados em sistema semi-intensivo. **Ciência Rural**, v.30, n.2, p.293-298, 2000.

SHLAES, DM et al. Society for healthcare epidemiology of America and infectious diseases society of America joint committee on the prevention of antimicrobial resistance: guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospital. **Clinical and Infectious Disease**, vol. 25, n. 3, p. 584- 599, 1997.

SHOEMAKER N. B. et al. Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and other genera in the

human colon. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 561–568, 2001.

SIMÕES, M. J. S.; FARACHE, A. F. Consumo de medicamentos em região do Estado de São Paulo (Brasil), 1985. **Revista de Saúde Pública**, v.22, n.6, 1988.

SMETS, B.F.; BARKAY, T. Horizontal gene transfer: Perspectives at a crossroads of scientific disciplines. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, p. 675–678, 2005.

SOMERVILLE, C.C. et al. Simple, rapid method for direct isolation of nucleic acids from aquatic environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, n. 3, p. 548-554, 1989.

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

SPANGGAARD, B. et al. The microflora of rainbow trout intestine: a comparison of traditional and molecular identification. **Aquaculture**, v. 182, p. 1-15, 2000.

SPELLBERG, B. et al. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Disease**, v. 46, p. 155–164, 2008.

SUGITA, H. et al. Bacterial flora of gastrointestinal tract of freshwater fishes in the river (Japan). **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v. 49, p.1387-1395, 1989.

TAVARES, W. - Resistência bacteriana. In “Antibióticos e quimioterápicos para uso Clínico”. 1ªed. São Paulo. Editora Atheneu, 2006. Cap. 5, p. 37-52.

TEBALDI, V.M.T. et al. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p.753-760, 2008.

TERNES, T.A et al. Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment. **Environmental Science and Technology**, v. 36, p. 3855–3863, 2002.

TRUST, T.J., et al. Obligate anaerobic bacteria in the gastrointestinal microflora of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), gold fish (*Carassius auratus*) and

rainbow trout (*Salmon gairdneri*). **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 36,n.10, p. 1174-1179, 1979.

U.S.FDA (FOOD & DRUG ADMINISTRATION) Center for Food Safety & Applied Nutrition (CFSAN), **Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook**. 1999, p.1-3.

VANDAMME, P. et al. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiology Reviews.**, v. 60, n. 2, p. 407–438, 1996.

VANDAMME, P. et al. Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov. (formerly *Burkholderia cepacia* Genomovar IV). **Journal of Clinical Microbiology**, v.3, p. 1042-1047, 2000.

VERNER-JEFFREYS, D.W., et al. Changes in the gut-associated microflora during the development of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae in three British hatcheries. **Aquaculture**, v.219, p. 21-42, 2003.

VONO. V. Estrutura da comunidade de peixes e de seus habitats na região litorânea de 2 lagos no médio Rio Doce. Minas Gerais - Brasil. ICB/UFMG. 2000.

WATTAL,C. et al. Prescription auditing and antimicrobial resistance at a tertiary care hospital in New Delhis, India. **Journal of Hospital Infectious**, v.59, n.2, p.156-158, 2005.

WEBER, J.T. et al. Epidemic cholera in Ecuador: multidrug-resistance and transmission by water and seafood. **Epidemiology and Infection**, v.112, p. 1–11, 1994.

WHITE,R.L. et al. Assessment of the relationship between antimicrobial usage and susceptibility: differences between the hospital and specific patient-care areas. **Clinical Infectious Diseases**, v.31, n.1, p.16-23, 2000.

WHO, Environmental health criteria for methylmercury. **Environmental Health Criteria**, v. 101, p. 144, Geneva, 1990.

WHO. **Antimicrobials in animal feed: a threat to human use: current topics**. v. 15, n. 3 & 4, 160-162, 2001.

WIGGINS, B.A. et al. Use of antibiotic resistance analysis to identify nonpoint sources of fecal pollution. **Applied and Environmental Microbiology**, vol 65, n. 8, p. 3483-2386. 1999.

WISE, R. et al. Antimicrobial Resistance - Major threat to public health. **Brithis Medical Journal**. v.317, n. 7159, p. 609-610, 1998.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiology Reviews**, v. 51, p. 221-271, 1987.

WU, S., et al. Composition, diversity, and origin of the bacterial community in grass carp intestine. **Plos One**, v.7. n.2, p.1-11, 2012

YANG, S.; CARLSON, K. Evolution of antibiotic occurrence in a river through pristine, urban and agricultural landscapes. **Water Research**, v.37, n.19, p.4645–4656, 2003.

YANG, Y.; YAO, J.; WANG, M. RAPD marker and substrate utilization pattern applied study microbial diversity in the soil affected by agricultural chemicals. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 39, p.125-138, 2004.

YOUNG, J.P.W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixation organisms. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. (eds). **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman & Hall, 1992. P.43-86.

ZELLERS, L. 1996. Fatty acid patterns of microbial phospholipids and lipopolysaccharides. *In*: SCHINNER, F; OHLINGER, G.; KANDELER, E. (ed.), **Methods in soil biology**. Springer Verlag, Heidelberg, Germany.

ZHANG, X.X.; ZHANG, T.; FANG, H. P. H. Antibiotic resistance genes in water environment. **Applied and Microbiology Biotechnology**, v.82, p.397-414, 2009.

ZUCCATO, E. et al. Presence of therapeutic drugs in the environment. **The Lancet**, v. 335, p.1789–1790, 2000.