



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ – UFC**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR – LABOMAR**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS**

**DIVERSIDADE E PADRÕES DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS EM  
BACTÉRIAS ISOLADAS DE OSTRAS (*Crassostrea rhizophorae*) E DO AMBIENTE  
AQUÁTICO**

**JACKSON RAFAEL OLIVEIRA PEIXOTO**

**FORTALEZA**

**2012**

JACKSON RAFAEL OLIVEIRA PEIXOTO

DIVERSIDADE E PADRÕES DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS EM  
BACTÉRIAS ISOLADAS DE OSTRAS (*Crassostrea rhizophorae*) E DO AMBIENTE  
AQUÁTICO

Dissertação de Mestrado submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais. Área de Concentração: Utilização e Manejo de Ecossistemas Marinhos e Estuarinos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Oscarina Viana de Sousa

FORTALEZA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Rui Simões de Menezes

---

P379d Peixoto, Jackson Rafael Oliveira

Diversidade e padrões de susceptibilidade a antimicrobianos em bactérias isoladas de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) e do ambiente aquático / Jackson Rafael Oliveira Peixoto. – 2012.  
161 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Fortaleza, 2012.

Área de Concentração: Utilização e manejo de ecossistemas marinhos e estuarinos

Orientação: Dra. Oscarina Viana de Sousa.

1. Ostra. 2. Água - Microbiologia. 3. Ação antibacteriana. I. Título.

---

CDD 639.41

JACKSON RAFAEL OLIVEIRA PEIXOTO

DIVERSIDADE E PADRÕES DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS EM  
BACTÉRIAS ISOLADAS DE OSTRAS (*Crassostrea rhizophorae*) E DO AMBIENTE  
AQUÁTICO

Dissertação de Mestrado submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais.

Aprovado em: \_\_/ \_\_/ \_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Oscarina Viana de Sousa (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira

Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Hedda Elisabeth Kolm

Universidade Federal do Paraná – UFPR

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, João Bosco e Zoraida, meu irmão, Ramiro, e à minha namorada, Meri, pessoas com quem posso contar em todos os momentos e que merecem toda a minha admiração e amor.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho jamais seria realizado sem o apoio de diversas pessoas, dentre todas elas agradeço:

Primordialmente aos meus pais e familiares;

À Meri pelo seu amor, apoio, compreensão e principalmente paciência nos momentos de dificuldades e estresse pelos quais eu passei nesse ano;

A Deus por sua imensa bondade, pelas pessoas maravilhosas com quem tive a possibilidade conviver e por tudo que me permitiu realizar;

À minha grande amiga Giselle Silva que sempre esteve do meu lado, apoiando nas realizações das pesquisas e publicações. Em nenhum momento encontra dificuldade em dizer sim, e será sempre minha parceira na Microbiologia;

À minha amiga Ludimila Conde que foi essencial na finalização deste trabalho;

À Professora Regine Vieira que disponibilizou e me acolheu em seu laboratório, uma grande pesquisadora e além de tudo uma poetisa; pelo carinho maternal e apoio durante todo o curso, visto que sem a sua ajuda esse trabalho não poderia ter sido realizado, e por contribuir de forma tão importante para minha formação profissional e humana;

À minha prima Margareth pela sua cumplicidade, amizade;

À minhas tias Zuila, Zenaide e Zuleide (*in memoriam*);

Ao meu amigo Rafael Rocha pela amizade, ouvidoria e contribuição com o meu trabalho, que em alguns momentos pode me dar suporte na elaboração deste trabalho com disponibilidade de bibliografias, esclarecimento sobre provas bioquímicas e bioestatística;

À Gleire Meneses que sempre me deu força com palavras de apoio e foi essencial na finalização do acabamento da redação dessa dissertação;

À Iara Pimentel e Adalva Machado que se dispusera a me ajudar, quando eu estava passando por dificuldades e perdas de pessoas em minha família;

À Camila Magalhães, Cristiane Teles, Edirsana Carvalho, Karla Catter e Marina Torres que em algum momento durante esses dois anos me ajudaram com palavras de apoio, amizade, doação de experiências e material bibliográfico;

Gostaria de agradecer as demais pessoas do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado, e desculpem aqui não particularizar todos, mas assim não esqueço ninguém, tenho a agradecer o companheirismo nos bons e maus momentos;

Ao Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará, por ter cedido todos os equipamentos e produtos para que eu pudesse realizar minhas análises;

Aos colegas de turma pela amizade e tantos bons momentos compartilhados;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar, da Universidade Federal do Ceará, pela generosidade ao dividirem sua experiência e conhecimentos;

A todos os meus amigos, tenho a agradecer a amizade, carinho, apoio, incentivo e coragem que sempre me deram em todos os momentos;

E a todos que direta e indiretamente contribuíram e sempre serão lembrados.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

À minha orientadora Oscarina Sousa uma grande pesquisadora e exemplo de personalidade, cuja capacidade e inteligência muitos gostariam de ter, meu agradecimento por sua amizade e apoio durante os quatro anos que a conheço, visto que sem a sua ajuda esse trabalho não poderia ter sido realizado, e por contribuir de forma tão importante para minha formação profissional e humana.

Ao Professor Gustavo Vieira (*in memoriam*) meu amigo e pai científico, pois foi ele que me apresentou o mundo da microbiologia e que me deu a oportunidade de pesquisar. Além de um orientador foi e sempre será aquele no qual irei me inspirar pelo seu caráter, suas conquistas, bondade e humildade.

À Renata Costa, pois foi com ela onde tudo começou, foi minha professora, colega, amiga, orientadora e parceira durante toda minha convivência na Microbiologia.

## RESUMO

Objetivou-se comparar a microbiota bacteriana presente no tecido mole (TM) e líquido intervalvar (LI) de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) e das águas do entorno de uma estrutura de cultivo e de um banco natural estabelecendo os perfis de resistência a antimicrobianos entre os isolados bacterianos. O material foi coletado no estuário do rio Jaguaribe, Fortim-CE, de outubro de 2010 a março de 2011. A temperatura, salinidade e pH das amostras de água variaram de 27 a 34 °C, 38 a 42, 8,13 a 8,42, respectivamente. Os tamanhos das conchas, peso do TM, volume do LI, pH do TM e LI variaram de 36,15 a 60,66 mm, 1,24 a 3,30 g, 0,65 a 3,26 mL, 6,11 a 6,64 e de 6,83 a 7,16, respectivamente. Nas contagens das BHC (bactérias heterotróficas cultiváveis) na água, LI e TM das ostras cultivadas (OC) e das ostras selvagens (OS), foram obtidos valores médios em unidades formadoras de colônias (UFC) de  $32 \times 10^3$  UFC/mL,  $57 \times 10^3$  UFC/mL,  $31,5 \times 10^4$  UFC/g,  $17 \times 10^3$  UFC/mL,  $31 \times 10^3$  UFC/mL e  $58,7 \times 10^3$  UFC/g, respectivamente. Nas contagens de *Vibrio* spp. na água, LI e TM das OC e das OS, os valores médios foram de 33,7 UFC/mL, 113 UFC/mL,  $40,5 \times 10^3$  UFC/g, 32,7 UFC/mL, 28,3 UFC/mL e 236 UFC/g, respectivamente. Dentre os parâmetros ambientais, apenas a salinidade apresentou influência ( $r > 0,9$  e  $P = 0,02$ ) sobre as contagens das BHC presentes nos LI das OC coletadas durante a estação chuvosa. Para a população cultivável de víbrios, nenhuma correlação foi estabelecida com os parâmetros ambientais. Das 118 culturas de BHC isoladas, 101 cepas foram identificadas e se distribuíram em 14 gêneros, sendo *Aeromonas*, *Vibrio* e *Bacillus*, os mais frequentes. Das 68 cepas de víbrios identificadas, a maior incidência foi de *V. ruber* (25,0%) e *V. coralliilyticus* (16,2%). Ampicilina (AMP), cefepima, cefotaxima, foram os antimicrobianos aos quais os isolados apresentaram os maiores percentuais de resistência (acima de 60%). Cloranfenicol (CLO) foi a única droga que teve 100% de resistência relacionada a plasmídeo entre as cepas de BHC, e para os víbrios foram: cloranfenicol, florfenicol e gentamicina. A concentração inibitória mínima variou de 32 a >128 mcg/mL para a Penicilina G nas BHC Gram-positivas, 16 a >128 mcg/mL de ampicilina nas BHC Gram-negativas, e de 16 a 128 mcg/mL de ampicilina para *Vibrio* spp. Os resultados indicaram a presença de cepas multirresistentes a antimicrobianos e uma significativa participação de elementos móveis nesses perfis. Além dos conhecidos riscos microbiológicos relacionados a ingestão de moluscos *in natura*, as ostras também podem desempenhar um importante papel como sítio de disseminação de resistência a vários antimicrobianos tanto de uso na clínica médica humana como veterinária.

Palavras-chave: bactérias heterotróficas, vibrio, malacocultura, multirresistência.

## ABSTRACT

The main objective of the following research was to compare the bacterial microbiota present in the soft tissue (ST) and intravalvular liquid (IL) of oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and water surroundings from a cultivation structure, as well as from a natural bank, establishing antimicrobial resistance profiles among bacterial isolates. The material was collected at the rio Jaguaribe estuary in Fortim-CE, from October 2010 to March 2011. Temperature, salinity and pH levels from water samples ranged from 27 to 34 °C; 38 to 42, and from 8.13 to 8.42, respectively. Shell sizes, ST weight, IL volume, ST and IL pH ranged from 36.15 to 60.66 mm; 1.24 to 3.30 g; 0.65 to 3.26 mL; 6.11 to 6.64, and from 6.83 to 7.16, respectively. Concerning in-water CHB (culturable heterotrophic bacteria) counting, cultured oysters (CO) and wild oysters (WO) IL and ST, the average values for in colony forming units (CFU) were of  $32 \times 10^3$  CFU/mL;  $57 \times 10^3$  CFU/mL;  $31.5 \times 10^4$  CFU/g;  $17 \times 10^3$  CFU/mL;  $31 \times 10^3$  CFU/mL, and  $58.7 \times 10^3$  CFU/g, respectively. Average values for in-water *Vibrio* spp. counting, CO and SO of the IL and ST were of 33.7 CFU/mL; 113 CFU/mL;  $40.5 \times 10^3$  CFU/g; 32.7 CFU/mL; 28.3 CFU/ml and 236 CFU/g, respectively. For environmental parameters, salinity only had influence ( $r > 0.9$  and  $P = 0.02$ ) on CHB countings in IL and ST collected during the rainy season. No relation was established between the environmental parameters and the culturable vibrios population. From the 118 CHB cultures isolated, 101 strains were identified and distributed in 14 genera. *Aeromonas*, *Vibrio*, and *Bacillus* were the most frequent. From the 68 strains of vibrios identified, the highest incidences were of *V. ruber* (25.0%) and *V. coralliilyticus* (16.2%). Ampicillins (AMP), cefepime, cefotaxime were the antimicrobials to which isolates presented higher resistance rates (above 60%). Chloramphenicol (CLO) was the only drug 100% related to plasmid resistance among THB strains. Regarding the vibrios, the antibiotics were the following: chloramphenicol, florfenicol, and gentamicin. The minimum inhibitory concentration ranged from 32 to  $> 128$  µg/ml for penicillin G in Gram-positive THBs; 16 to  $> 128$  µg/ml ampicillin in Gram-negative THBs; 16 to 128 µg/mL ampicillin for *Vibrio* spp. The results indicated the presence of antimicrobials multidrug-resistant strains and a significant share of mobile elements in these profiles. Besides the well-known microbiological hazards related to fresh clams' intake, oysters may also play an important role as a resistance spreading site to several antimicrobial with potential use on both human and veterinary medicine.

Keywords: heterotrophic bacteria, vibrio, malacoculture, multidrug resistance.

## LISTA DE FIGURAS

|          |   |  |    |
|----------|---|--|----|
| Figura 1 | – | Localização da área de coleta das ostras ( <i>Crassostrea rhizophorae</i> ) selvagens e cultivadas na região do rio Jaguaribe (Pontal do Maceió em Fortim – Ceará).....  | 45 |
| Figura 2 | – | Etapas do processamento das amostras de água da área de coleta, do tecido e líquido intervalvar das ostras cultivadas e selvagens coletadas no estuário do rio Jaguaribe, Ceará, para contagem de bactérias heterotróficas cultiváveis.....  | 48 |
| Figura 3 | – | Etapas do processamento das amostras de água da área de coleta, do tecido e líquido intervalvar das ostras cultivadas e selvagens coletadas no estuário do rio Jaguaribe, Ceará, para contagem de víbrios.....   | 49 |
| Figura 4 | – | Esquema do método de difusão em disco, utilizado para determinar o perfil de susceptibilidade das cepas das populações das bactérias heterotróficas cultiváveis e de <i>Vibrio</i> , isoladas das amostras de água da área de coleta, do tecido e líquido intervalvar das ostras cultivadas e selvagens coletadas no estuário do rio Jaguaribe, Ceará..... | 53 |
| Figura 5 |   | Esquema do procedimento de <i>cura</i> plasmidial, ao qual foram submetidas às estirpes bacterianas com perfil de multirresistência aos antimicrobianos testados.....  | 54 |

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Percentual de susceptibilidade a antimicrobianos entre linhagens de bactérias Gram-positivas isoladas das amostras de águas e ostras (líquido intervalvar e tecido) coletadas área do rio Jaguaribe (Pontal do Maceió em Fortim – Ceará)..... 91
- Gráfico 2 – Percentual de susceptibilidade a antimicrobianos entre linhagens de bactérias Gram-negativas isoladas de amostras de águas e ostras (líquido intervalvar e tecido) coletadas na área do rio Jaguaribe (Pontal do Maceió em Fortim – Ceará)..... 93
- Gráfico 3 – Percentual de susceptibilidade a antimicrobianos entre cepas de *Vibrio* spp. isoladas das amostras de águas e ostras (líquido intervalvar e tecido) coletadas área do rio Jaguaribe (Pontal do Maceió em Fortim – Ceará)..... 95

## LISTA DE QUADROS

|          |  |    |
|----------|--|----|
| Quadro 1 | – Interpretação dos halos de inibição para as cepas da população Gram-positiva das bactérias heterotróficas cultiváveis segundo o CLSI (2010).....                 | 51 |
| Quadro 2 | – Interpretação dos halos de inibição para as cepas de <i>Vibrio</i> e população Gram-negativas das bactéria heterotróficas cultiváveis segundo o CLSI (2010)..... | 52 |

## LISTA DE TABELAS

|          |  |    |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | – Média e desvio padrão dos parâmetros físico-químicos das amostras de água nos pontos de coleta de ostras ( <i>Crassostrea rhizophorae</i> ) durante os períodos de estio e chuvoso, no estuário do rio Jaguaribe (Pontal do Maceió, Fortim – Ceará).....   | 57 |
| Tabela 2 | – Média e desvio padrão das medidas morfométricas e físico-químicas dos espécimes de ostras ( <i>Crassostrea rhizophorae</i> ) selvagens e cultivadas, coletadas na área do rio Jaguaribe (Pontal do Maceió em Fortim – Ceará).....  | 60 |
| Tabela 3 | – Contagens de bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC) nas amostras de água, líquido intervalvar e tecido de ostras ( <i>Crassostrea rhizophorae</i> ) cultivadas e selvagens, coletadas no período de estio e chuvoso no Pontal do Maceió em Fortim – Ceará.....   | 62 |
| Tabela 4 | – Contagens de <i>Vibrio</i> spp. nas amostras de água, líquido intervalvar e tecido de ostras ( <i>Crassostrea rhizophorae</i> ) cultivadas e selvagens, coletadas no período de estio e chuvoso no Pontal do Maceió em Fortim – Ceará.....   | 68 |
| Tabela 5 | – Distribuição das linhagens identificadas de bactérias heterotróficas cultiváveis Gram-positivas e Gram-negativas por amostras de água, líquido intervalvar e tecidos moles de ostras <i>Crassostrea rhizophorae</i> coletadas em uma estrutura de cultivo e em banco natural do estuário do Jaguaribe (Fortim – CE)..... | 72 |
| Tabela 6 | – Distribuição de acordo com as características morfotintoriais e identificação das espécies bacterianas isoladas das amostras de água, líquido intervalvar e tecidos moles ostras ( <i>Crassostrea rhizophorae</i> ), coletadas no estuário do Jaguaribe (Fortim – CE), durante a estiagem e a estação chuvosa.....       | 73 |
| Tabela 7 | – Distribuição do número de cepas de <i>Vibrio</i> spp. por amostras de água, líquido intervalvar e tecidos moles de ostras ( <i>Crassostrea rhizophorae</i> ) obtidas em uma estrutura de cultivo e um banco natural, no estuário do Jaguaribe (Fortim – CE), durante a estiagem e a estação chuvosa.....                 | 85 |

|           |  |     |
|-----------|--|-----|
| Tabela 8  | – Perfis de resistência entre cepas bacterianas Gram-positivas, isoladas das amostras de águas e ostras (líquido intervalvar e tecido), coletadas na área do rio Jaguaribe (Pontal do Maceió em Fortim – Ceará).....   | 101 |
| Tabela 9  | – Perfis de resistência entre cepas Gram-negativas das bactérias heterotróficas cultiváveis, isoladas das amostras de águas e ostras (líquido intervalvar e tecido), coletadas na área do rio Jaguaribe (Pontal do Maceió em Fortim – Ceará).....                        | 104 |
| Tabela 10 | – Perfis de resistência entre cepas de <i>Vibrio</i> spp. isoladas das amostras de águas e ostras (líquido intervalvar e tecido), coletadas na área do rio Jaguaribe (Pontal do Maceió em Fortim – Ceará).....   | 107 |
| Tabela 11 | – Perfis de resistência e multirresistência das cepas Gram-positivas das bactérias heterotróficas cultiváveis, isoladas das amostras de águas e ostras (líquido intervalvar e tecido), coletadas na área do rio Jaguaribe (Pontal do Maceió em Fortim – Ceará).....      | 109 |
| Tabela 12 | – Perfis de resistência e multirresistência das cepas bacterianas Gram-negativas, isoladas das amostras de águas e ostras (líquido intervalvar e tecido), coletadas na área do rio Jaguaribe (Pontal do Maceió em Fortim – Ceará).....                                   | 112 |
| Tabela 13 | – Perfis de resistência e multirresistência das cepas de <i>Vibrio</i> spp., isoladas das amostras de águas e ostras (líquido intervalvar e tecido), coletadas na área do rio Jaguaribe (Pontal do Maceió em Fortim – Ceará).....  | 117 |
| Tabela 14 | – Caracterização da origem da resistência em linhagens de bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC) Gram-positivas isoladas das amostras de águas e ostras (líquido intervalvar e tecido), coletadas na área do rio Jaguaribe (Pontal do Maceió em Fortim – Ceará)..... | 121 |
| Tabela 15 | – Caracterização da origem da resistência em linhagens de bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC) Gram-negativas isoladas das amostras de águas e ostras (líquido intervalvar e tecido), coletadas na área do rio Jaguaribe (Pontal do Maceió em Fortim – Ceará)..... | 123 |

|           |  |     |
|-----------|--|-----|
| Tabela 16 | – Caracterização da origem da resistência em cepas de <i>Vibrio</i> spp. isoladas das amostras de águas e ostras (líquido intervalvar e tecido), coletadas na área do rio Jaguaribe (Pontal do Maceió em Fortim – Ceará).....  | 126 |
| Tabela 17 | – Concentração inibitória mínima (CIM) da penicilina G (PEN) e ampicilina (AMP), por linhagem de bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC) Gram-positiva e Gram-negativa multirresistente, respectivamente isoladas das amostras de águas e ostras (líquido intervalvar e tecido), coletadas na área do rio Jaguaribe (Pontal do Maceió em Fortim – Ceará)..... | 128 |
| Tabela 18 | – Concentração inibitória mínima (CIM) da ampicilina (AMP) para as cepas de <i>Vibrio</i> multirresistentes isoladas das amostras de águas e ostras (líquido intervalvar e tecido), coletadas na área do rio Jaguaribe (Pontal do Maceió em Fortim – Ceará).....   | 131 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|      |   |
|------|---|
| CAMP | Christie, Atkins e Munch-Petersen           |
| MG   | Média geométrica                            |
| G+   | Gram-positiva                               |
| G-   | Gram-negativa                               |
| AMP  | Ampicilina                                  |
| AO   | <i>Acridine orange</i>                      |
| ATM  | Aztreonam                                   |
| B1   | Biótipos 1                                  |
| B2   | Biótipos 2                                  |
| B3   | Biótipos 3                                  |
| BHC  | Bactérias heterotróficas cultiváveis        |
| BN   | Banco natural                               |
| ca.  | Cerca de                                    |
| CE   | Ceará                                       |
| CFL  | Cefalotina                                  |
| CFO  | Cefoxitina                                  |
| CIM  | Concentração inibitória mínima              |
| CIP  | Ciprofloxacina                              |
| CLO  | Cloranfenicol                               |
| CLSI | Clinical and Laboratory Standards Institute |
| CNI  | Cepas não identificadas                     |
| COI  | Citocromo c oxidase                         |
| CPM  | Cefepima                                    |
| CTX  | Cefotaxima                                  |
| DNA  | Ácido desoxirribonucleico                   |
| DTAs | Doenças transmitidas por alimentos          |
| EC   | Estrutura de cultivo                        |
| ERI  | Eritromicina                                |
| EST  | Estreptomicina                              |
| est. | Estimado                                    |
| FAO  | Food and agriculture organization           |
| FDA  | Food and Drug Administration                |

|         |   |
|---------|---|
| FLF     | Florfenicol   |
| GEN     | Gentamicina   |
| I       | Intermediárias                                      |
| LABOMAR | Instituto de ciências do mar                        |
| LB      | Luria Bertani                                       |
| LI      | Líquido intervalvar                                 |
| MAPA    | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| MAR     | Índice de múltipla resistência                      |
| MH      | Mueller-Hinton                                      |
| N       | Número de cepas                                     |
| NAL     | Ácido nalidíxico                                    |
| NIT     | Nitrofurantoína                                     |
| OC      | Ostras cultivadas                                   |
| OMS     | Organização Mundial de Saúde                        |
| ONPG    | Orto-nitrofenio- $\beta$ -d-galacto-piranosídeo     |
| OS      | Ostras selvagens                                    |
| OTC     | Oxitetraciclina                                     |
| PCA     | Plate count agar                                    |
| PEN     | Penicilina G  |
| pH      | Potencial hidrogeniônico                            |
| R       | Resistentes   |
| RS      | Resistência simples                                 |
| S       | Sensíveis   |
| SUT     | Sulfazotrim   |
| TCBS    | Tiosulfato-citrato-bile-sacarose                    |
| TDH     | Hemolisina direta termoestável                      |
| TET     | Tetraciclina  |
| TM      | Tecidos moles                                       |
| TRH     | Hemolisina direta relacionada                       |
| TSA     | Ágar triptona soja                                  |
| TSB     | Caldo triptona de soja                              |
| UFC     | Unidades formadoras de colônias                     |
| VNC     | Viável, mas não cultivável                          |

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....  | 21 |
| <b>2 OBJETIVOS</b> .....   | 24 |
| <b>2.1 Objetivo geral</b> .....  | 24 |
| <b>2.2 Objetivos específicos</b> .....   | 24 |
| <b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....   | 26 |
| <b>3.1 Aquicultura</b> .....   | 26 |
| <b>3.2 <i>Crassostrea rhizophorae</i>: uma espécie nativa do Brasil</b> .....                          | 27 |
| <b>3.3 Microbiota natural das ostras</b> .....   | 27 |
| <b>3.3.1 Baterias heterotróficas cultiváveis (BHC)</b> .....   | 27 |
| <b>3.3.2 <i>Vibrio spp.</i></b> .....  | 29 |
| <b>3.3.2.1 Principais espécies de <i>Vibrio</i> que ocorrem em águas costeiras e em bivalves</b> ..... | 31 |
| <b>3.3.2.1.1 <i>Vibrio alginolyticus</i></b> .....   | 31 |
| <b>3.3.2.1.2 <i>Vibrio cholerae</i></b> .....  | 31 |
| <b>3.3.2.1.3 <i>Vibrio coralliilyticus</i></b> .....   | 31 |
| <b>3.3.2.1.4 <i>Vibrio harveyi</i></b> .....   | 32 |
| <b>3.3.2.1.5 <i>Vibrio metschnikovii</i></b> .....   | 32 |
| <b>3.3.2.1.6 <i>Vibrio mimicus</i></b> .....   | 33 |
| <b>3.3.2.1.7 <i>Vibrio parahaemolyticus</i></b> .....  | 33 |
| <b>3.3.2.1.8 <i>Vibrio pectenicida</i></b> .....   | 34 |
| <b>3.3.2.1.9 <i>Vibrio ruber</i></b> .....   | 35 |
| <b>3.3.2.1.10 <i>Vibrio tasmaniensis</i></b> .....   | 35 |
| <b>3.3.2.1.11 <i>Vibrio vulnificus</i></b> .....   | 35 |
| <b>3.4 Antimicrobianos no ambiente aquático</b> .....  | 36 |
| <b>3.4.1 Principais classes de antimicrobianos</b> .....   | 38 |
| <b>3.4.1.1 Aminoglicosídeos</b> .....  | 38 |
| <b>3.4.1.2 Cefalosporinas</b> .....  | 39 |
| <b>3.4.1.3 Fenicóis</b> .....  | 40 |
| <b>3.4.1.4 Macrolídeos</b> .....   | 40 |
| <b>3.4.1.5 Monobactâmicos</b> .....  | 41 |
| <b>3.4.1.6 Nitrofuranos</b> .....  | 41 |
| <b>3.4.1.7 Penicilinas</b> .....   | 41 |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.4.1.8 Quinolonas.....   | 42        |
| 3.4.1.9 Sulfonamidas.....   | 43        |
| 3.4.1.10 Tetraciclinas.....   | 44        |
| <b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>  | <b>44</b> |
| <b>4.1 Descrição da área.....</b>   | <b>46</b> |
| <b>4.2 Coletas.....</b>   | <b>46</b> |
| <b>4.3 Análises.....</b>  | <b>46</b> |
| <b>4.3.1 Análises físico-químicas.....</b>                                      | <b>46</b> |
| 4.3.1.1 Água.....   | 46        |
| 4.3.1.2 Ostras.....   | 46        |
| <b>4.3.2 Análises Microbiológicas.....</b>                                      | <b>47</b> |
| 4.3.2.1 Processamento e diluição das amostras.....                              | 47        |
| 4.3.2.2 Contagem de bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC).....             | 47        |
| 4.3.2.3 Contagem de vibrios.....  | 48        |
| 4.3.2.4 Identificação bioquímica das BHC.....                                   | 50        |
| 4.3.2.5 Identificação bioquímica de <i>Vibrio spp.</i> .....                    | 50        |
| 4.3.2.6 Antibiograma.....   | 50        |
| 4.3.2.7 Processo de cura de plasmídeo.....                                      | 53        |
| 4.3.2.8 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....               | 54        |
| 4.3.2.8.1. Preparo das soluções estoque dos antimicrobianos.....                | 55        |
| 4.3.2.8.1.1 Ampicilina.....   | 55        |
| 4.3.2.8.1.2 Penicilina G.....   | 55        |
| 4.3.2.8.2 Preparo dos tubos com antimicrobianos.....                            | 55        |
| 4.3.2.8.3 Preparo do inóculo.....   | 55        |
| 4.3.2.8.4 Interpretação dos resultados.....                                     | 56        |
| 4.3.2.8 Cálculo do índice de múltipla resistência antimicrobiana (MAR).....     | 56        |
| <b>4.4 Análise estatística.....</b>   | <b>56</b> |
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>  | <b>57</b> |
| <b>5.1 Parâmetros físico-químicos da água nas áreas de coleta.....</b>          | <b>57</b> |
| <b>5.2 Morfometria e parâmetros físico-químicos das ostras.....</b>             | <b>59</b> |
| <b>5.3 Quantificação de bactérias heterotróficas cultiváveis.....</b>           | <b>61</b> |
| <b>5.4 Quantificação de <i>Vibrio spp.</i>.....</b>                             | <b>67</b> |
| <b>5.5 Diversidade bacteriana cultivável.....</b>                               | <b>70</b> |
| <b>5.6 Perfis de suscetibilidade dos isolados frente a antimicrobianos.....</b> | <b>90</b> |

|   |            |
|---|------------|
| <b>5.7 Origem genética da resistência.....</b>                        | <b>121</b> |
| <b>5.8 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) .....</b> | <b>128</b> |
| <b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>                                    | <b>133</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>   | <b>134</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O aumento do cultivo de moluscos bivalves no Brasil ocorre, principalmente, devido às condições propícias dos ambientes costeiros que satisfazem as necessidades requeridas para esse tipo de atividade (PEREIRA *et al.*, 2007). As ostras da espécie *Crassostrea rhizophorae* são consumidas habitualmente *in natura* sem nenhuma forma de cocção prévia. Consumido dessa forma, esse alimento tem um forte potencial em causar danos à saúde pública (ARCHER; MORETTO, 1994; EDUOK *et al.*, 2010; MORAES *et al.*, 2000; ODI *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2007; PEREIRA, 2002; PEREIRA; VIANA; RODRIGUES, 2004, 2007; REYES-VELÁZQUEZ *et al.*, 2010).

As espécies de ostras que são utilizadas na gastronomia brasileira são a *C. gigas*, *C. rhizophorae* e *C. brasiliana*, as últimas por sua vez são espécies nativas, que se encontram distribuídas geograficamente pela região sul do Caribe, Venezuela, Suriname e do Brasil até o Uruguai (AMARAL, 2010; RIOS, 1994; IGNACIO *et al.*, 2000). No Nordeste brasileiro a *C. rhizophorae* é a principal espécie explorada comercialmente (VIEIRA; VASCONCELOS; CARVALHO, 2007).

Os moluscos bivalves são animais que se encontram fixos em substratos, habitam estuários de rios e da costa marítima, onde filtram a água para captar alimentos, concentrando no interior do seu organismo, principalmente em suas brânquias e intestino, todas as partículas e micro-organismos resultantes do filtrado (MORAES *et al.*, 2000; RIOS, 1994). Esse padrão alimentar faz com que esses organismos aquáticos sejam utilizados como indicadores biológicos de contaminação das águas de onde são extraídos, tanto no aspecto microbiológico como no químico (PEREIRA *et al.*, 2007).

A capacidade filtradora e de bioacumulação das ostras faz com que a quantidade de bactérias em seu intestino seja superior à encontrada na água em sua volta, uma vez que um único espécime possui a habilidade de filtrar cerca de quatro (4) litros de água por hora, (VIEIRA; VASCONCELOS; CARVALHO, 2007).

Dentre a microbiota presente nas ostras, as bactérias heterotróficas são as mais estudadas, a fim de determinar sua diversidade, abundância ou até mesmo a pesquisa de espécies patogênicas existente neste grupo. As bactérias heterotróficas possuem um importante papel ecológico, sendo responsáveis pela degradação da matéria orgânica e ciclagem de nutrientes (ALLEN; EDBERG; REASONER, 2004; ALTERTHUM, 2005). Em ecossistemas aquáticos atuam principalmente na remoção do nitrogênio (MAZOUNI, 2004; NUNES, 2009; ZHAO; HE; ZHANG, 2010).

As bactérias heterotróficas compõem um grupo ecologicamente importante e estão distribuídas por todo o mundo, e em alguns trabalhos foi possível observar sua população em tecidos de ostras superior à encontrada na água circundante, com uma ordem de grandeza de  $10^2$  a  $10^4$  unidades formadoras de colônias (UFC) por grama (PUJALTE *et al.*, 1999; VIEIRA; VASCONCELOS; CARVALHO, 2007).

É de conhecimento, que uma pequena parcela das bactérias heterotróficas é patogênica ao homem e/ou aos animais, e algumas delas são dos seguintes gêneros: *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia*, *Proteus* e *Clostridium* (CRUZ-ROMERO; KERRY; KELLY, 2008). No entanto, segundo Michaud *et al.* (2006) a grande parcela das bactérias heterotróficas pode atuar em relações ecológicas de mutualismo e/ou competição direta incluindo espécies patogênicas.

A detecção, em ostras, de várias espécies do gênero *Vibrio* reconhecidas como patógenos humanos já foi relatada (CHATZIDAKI-LIVANIS *et al.*, 2006; DALSGAARD, 1998; ODI *et al.*, 2011; PEREIRA; VIANA; RODRIGUES, 2007). Em regiões com acentuadas variações de temperatura, a maior frequência de isolamento desses micro-organismos costuma ser mais alta no verão (VIANA; RODRIGUES, 2007).

Pereira (2002), analisando dados das autoridades sanitárias americanas observou a existência de uma relação positiva entre a temperatura da água de ambientes costeiros e o número de isolados patogênicos em casos de infecções humanas. Esta relação é particularmente importante para *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*.

Os patógenos supracitados são responsáveis por diversas enfermidades, dentre as quais, destacam-se as manifestações gastrintestinais e extra-intestinais, estas últimas caracterizadas por infecção cutânea e otites, especialmente em manipuladores de alimentos, profissionais do ramo da pesca e mergulhadores (PEREIRA *et al.*, 2007).

Dentre as principais espécies reconhecidas como patogênicas para o homem estão incluídos: *Vibrio cholerae* O1, *V. cholerae* O139, *V. cholerae* não-O1, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *V. alginolyticus*. Particularmente, a espécie *V. cholerae* sorotipo O1 é responsável por epidemias e pandemias de cólera registradas desde 1817 e o sorotipo O139 tem sua ocorrência nos países do continente asiático (EILER; JOHANSSON; BERTILSSON, 2006; PEREIRA *et al.*, 2007).

Tradicionalmente, o consumo de ostras se faz *in natura* em muitos dos estados brasileiros, inclusive no Ceará, e é comum a descrição de surtos de doenças transmitidas pelos alimentos ligados ao consumo de moluscos (CHAO *et al.*, 2009; MCLAUGHLIN *et al.*, 2005; MORAES *et al.*, 2000; RODRIGUEZ; HARIHARAN; NIMROD, 2011).

Esta pesquisa se fundamenta na importância crescente da extração e cultivo de moluscos bivalves impulsionados pela elevação do consumo desse tipo de alimento e o risco potencial para a saúde que este representa devido à forma de ingestão *in natura*. O conhecimento da diversidade de bactérias nos tecidos das ostras e sua dinâmica de colonização podem auxiliar na adoção de medidas preventivas para a segurança alimentar da população.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Comparar quantitativa e qualitativamente a microbiota bacteriana presente no tecido e líquido intervalvar de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) cultivadas e selvagens, como também das águas do entorno de uma estrutura de cultivo e um banco natural, e estabelecer os perfis de resistência a antimicrobianos entre os isolados bacterianos.

### 2.2 Objetivos específicos:

1. Determinar o pH, salinidade e temperatura da água nos locais de coleta das ostras;
2. Determinar a biometria, o peso total do tecido e o volume total do líquido intervalvar de espécimes de ostras cultivadas e selvagens do litoral leste do Ceará;
3. Determinar o pH do tecido e líquido intervalvar das ostras coletadas;
4. Determinar as unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC) e do gênero *Vibrio* nas amostras de água, tecido e líquido intervalvar, separadamente;
5. Isolar, purificar estirpes de BHC e do gênero *Vibrio* e identificá-las fenotipicamente utilizando esquemas baseados nas características morfotintoriais e bioquímicas;
6. Determinar o perfil de suscetibilidade dos isolados frente a antimicrobianos (antibiograma);
7. Estabelecer a origem genética da resistência entre as cepas com perfil de multirresistência (2 ou mais antibióticos de classes diferentes) através da técnica da “cura”;
8. Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) para os antimicrobianos aos quais as estirpes apresentarem resistência.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Aquicultura

A aquicultura apresenta um importante papel sócio-econômico para a humanidade, principalmente devido à possibilidade de ser uma solução no combate à fome, pois, além de ser uma rica fonte em proteína animal (LIBRELATO; LOPES-SHIKIDA, 2005; RODGERS; FURONES, 2009), o seu crescimento teve uma taxa média anual de 8,3% entre 1970 e 2008. No mesmo período, a população mundial cresceu a uma média de 1,6% ao ano. De 2006 a 2008, a parcela de participação da aquicultura na produção mundial de pescado passou de 34,5% para 36,9% (FAO, 2010).

Segundo a Food and Agriculture Organization (FAO), em 2008, a produção de pescado mundial foi liderada pelos peixes de água doce com 28,8 milhões de toneladas (54,7%), correspondendo a 40,5 bilhões de dólares (41,2%), seguido pelos moluscos com 13,1 milhões de toneladas. No mesmo ano, a produção de moluscos foi composta por ostras (31,8%), amêijoas (24,6%), mexilhões (12,4%) e vieiras (10,7%) (FAO, 2010). A região Ásia-Pacífico é responsável por 89% e 95% da produção mundial de pescado e ostra, respectivamente, no entanto, só a China contribui com 82% da oferta global de ostras (FAO, 2009). Na América Latina, quatro países (Brasil, Chile, Equador e México) recebem destaque pela FAO pelo desenvolvimento na aquicultura e produção crescente de pescados como salmão, truta, tilápia, camarão e moluscos (FAO, 2010).

No Brasil, de 1996 a 2004, a aquicultura teve um crescimento de 344,2% na produção total, e a maricultura cresceu 947,2%, subsidiada pela forte demanda dos cultivos de ostras e camarões marinhos nas regiões Sul e Nordeste, respectivamente. O Nordeste brasileiro é responsável por 79,5% dos cultivos de organismos marinhos representados por camarão (99,99%) e ostra (0,01%); e o Sul por 19% pelo cultivo de mexilhões e ostras (OSTRENSKY; BORCHETTI; SOTO, 2008).

Dos 25 (vinte e cinco) principais organismos cultivados no Brasil, a ostra ocupa a décima posição no ranking nacional da produção aquícola, com a participação de 1% (2.682 toneladas). Entre os moluscos, a produção de ostra ocupa a segunda posição com percentual de 20,5%, sendo desbancada pelo cultivo de mexilhões (*Perna perna*), com 79,5%. Ainda são cultivados coquiles e vieiras que somados tem uma participação de 0.008%, equivalente a 1 tonelada (OSTRENSKY; BORCHETTI; SOTO, 2008).

O cultivo de moluscos foi introduzido no Brasil desde 1960, mas somente a partir de 1989 que essa atividade passou a representar uma importante alternativa econômica para a comunidade caiçara. O crescimento da malacocultura é evidenciado nos dados de produção de 1995 a 2003, onde a produção passou de 55 toneladas a 2.196 toneladas. O Estado de Santa Catarina é o principal produtor de ostra, com uma parcela de 93% da produção brasileira (FAO, 2004).

Segundo Legat *et al.* (2009) a exploração de ostras nativas (*C. rhizophorae* e *C. brasiliiana*) nas regiões Norte e Nordeste é necessária, para que ocorra a despolarização da malacocultura do Sul e Sudeste brasileiro, que cultivam a *C. gigas*, uma espécie exógena que se adapta melhor ao clima frio, visto que o potencial para a malacocultura na costa norte e nordeste é enorme para as espécies *C. rhizophorae* e *C. brasiliiana* (FAO, 2004).

As perspectivas sobre a produção de ostras no Brasil são as melhores, em virtude da disponibilidade regular de semente de ostra em incubadoras, que viabilizam a atividade mostrando um crescimento estável. Este fato pode ser confirmado com os dados de produção (FAO, 2004).

### **3.2 *Crassostrea rhizophorae*: uma espécie nativa do Brasil**

A *Crassostrea rhizophorae* ou ostra do mangue, como é conhecida entre os marisqueiros é um molusco bivalve pertencente à família Ostreoidae, da ordem Ostreoida. A espécie possui duas conchas irregulares e ásperas, de coloração acinzentada podendo medir de 10 a 12 cm. Habitam ambientes marinhos e estuarinos, são bentônicos e vivem em substratos rochosos ou raízes aéreas das árvores do mangue, podendo formar agregados submersos (LAZOSKI, 2011; RIOS, 1994).

A *C. rhizophorae* é um organismo filtrador, que se alimenta de micro-organismos presentes na água e partículas em suspensão. A espécie pode apresentar-se como dióica ou monóica (LENZ; BOEHS, 2011). A dicogamia apresentada pela *C. rhizophorae* é do tipo potandria confirmada por alguns autores (POUVREAU *et al.*, 2000; PRIETO; MONTES; RUIZ, 2008), que relatam a constante atividade gonadal que a ostra possui mudando de sexo de acordo com a idade, contribuindo para uma alta taxa de reprodução da espécie.

Por conta da alta reprodutividade realizada durante todo o ano a espécie *Crassostrea rhizophorae* é recomendada para cultivo principalmente nas regiões onde ela é nativa (LENZ; BOEHS, 2011).

A distribuição geográfica da *C. rhizophorae* é assunto de muita discussão e divergência entre os autores, principalmente por conta das variações intraespecíficas (AMARAL, 2010) e do elevado grau de plasticidade fenotípica (MELO *et al.*, 2010), em que a morfologia da concha é de valor limitado para identificação e diferenciação entre as espécies que habitam a costa atlântica da América Latina.

Segundo Rios (1994), a *C. rhizophorae* encontra-se distribuída desde o sul do Caribe até o Uruguai. Amaral (2010) afirma que a espécie se estende do Caribe até o Rio Grande do Sul, sendo exclusiva de manguezais. No Brasil, a espécie se perpetua do Estado do Ceará a Santa Catarina, sendo que no Ceará especificamente em Fortim, a *C. rhizophorae* foi a única espécie encontrada e confirmada por sequenciamento da subunidade I do citocromo c oxidase (COI) (LAZOSKI, 2011).

A ostra apresenta importância que ultrapassa os fatores econômicos e alimentares, pois o cultivo desses organismos pode desempenhar papéis ecológicos fundamentais na redução de carbono atmosférico. Uma das formas é a bomba biológica, que sequestra o carbono da atmosfera para a formação de suas conchas, através da precipitação biogênica de carbonatos (CASTRO *et al.*, 2010); outro fator interessante, é que a malacocultura não emite metano, ao contrário da pecuária que remete 37% de toda emissão antrópica (FAO, 2010).

O cultivo de ostras (*C. rhizophorae*) e macroalgas (*Gracillaria* spp.) associado a outras espécies (camarão ou peixe), pode qualificar a aquicultura como autossustentável. Ostra e algas funcionariam como filtros naturais de partículas em suspensão e de nutrientes no canal de drenagem, o que melhoraria a qualidade da água antes de seu retorno para os viveiros e/ou para o meio ambiente, além de gerar renda ao aquicultor na comercialização dos dois organismos (OSTRENSKY; BORCHETTI; SOTO, 2008).

### **3.3 Microbiota natural das ostras**

#### **3.3.1 Bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC)**

As bactérias podem ser divididas de acordo com o seu metabolismo. Essa classificação consiste na capacidade de utilizarem o carbono para a produção de moléculas orgânicas, sendo classificadas de bactérias autotróficas e heterotróficas (PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1996).

As bactérias autotróficas captam o átomo de carbono diretamente do gás carbono (CO<sub>2</sub>) ou de íons de bicarbonatos a partir do qual sintetizam todos os elementos que

necessitam, e as heterotróficas utilizam os átomos de carbono das moléculas orgânicas presentes no ambiente (ALTERTHUM, 2005; PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1996).

As bactérias heterotróficas são micro-organismos degradadores da matéria orgânica disponível no ambiente, que usam o carbono como principal fonte de energia, sendo extraído de organismos em decomposição. Estes são ricos em carboidratos, particularmente D-glicose, aminoácidos, ácidos monocarboxílicos, lipídeos e alcoóis. Além desses compostos, essas bactérias são capazes de utilizar até mesmo polímeros tais como o amido e a celulose (ALTERTHUM, 2005), podendo ser encontradas em diversos *habitats* desde corpos d'água, alimentos, solo, vegetação e atmosfera (ALLEN; EDBERG; REASONER, 2004).

Por sua capacidade decompositora, as bactérias heterotróficas possuem um papel fundamental no ciclo de vida, sendo responsáveis pela reciclagem dos nutrientes. Essa atividade permite que a matéria orgânica presente nos organismos mortos seja transformada em matéria inorgânica, como os sais minerais, que são liberados no ambiente para ser absorvidos por outros organismos, como as plantas, reiniciando o ciclo ecológico. As bactérias heterotróficas podem ser classificadas como micro-organismos decompositores ou saprófitos (KARIATSUMARI; SILVA, 2008).

Segundo Reche, Pittol e Fiuza (2010) as BHC podem ser encontradas em abundância nos efluentes urbanos e rios que sofreram algum tipo de pressão antrópica apresentando altos níveis de nutrientes na água. Por tanto o número elevado desta população pode ser utilizado como diagnóstico da poluição orgânica ambiental procedente do excesso de matéria orgânica.

No entanto, Cunha-Santino, Sciessere e Bianchini Júnior (2008) destacam a importância da participação desses micro-organismos no ciclo de nutrientes. Os autores relatam o papel fundamental das BHC na transformação da matéria orgânica particulada que ocorre através do seu metabolismo osmotrófico, tanto de ambientes lóticos quanto lênticos, e que tais características são fundamentais para a dinâmica dos ciclos de carbono, de nutrientes e para o fluxo de energia dos ecossistemas aquáticos.

Concordando com os autores anteriores, Thomaz (1999) enfoca ainda que as bactérias são responsáveis pela base da cadeia alimentar juntamente com o fitoplâncton, e não somente pela mineralização da matéria orgânica. Por isso, as mesmas têm a função de incorporar o carbono orgânico dissolvido e transformá-lo em frações menores. Assim o carbono que seria perdido da cadeia é reincorporado nas bactérias que, por sua vez, servem de alimento para protistas.

Em corpos d'água, o nitrogênio (N) pode estar presente em diferentes formas, por exemplo, como amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e associação com compostos

orgânicos, sendo que muitas destas formas são tóxicas aos organismos. O nitrogênio é um nutriente essencial para o desenvolvimento biológico e um dos principais componentes dos organismos vivos (NUNES, 2009). Na natureza, algumas bactérias também são responsáveis pela remoção biológica do nitrogênio (N) do ambiente, através de dois processos: nitrificação realizado pelas bactérias autotróficas; e desnitrificação, com envolvimento de grupos bacterianos heterotróficos. As bactérias desnitrificantes convertem o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) em gás nitrogênio ( $\text{N}_2$ ) sob condições anóxicas, usando nitrato ao invés de oxigênio como agente de oxidação (NUNES, 2009; ZHU *et al.*, 2009).

### 3.3.2 *Vibrio spp.*

O agente etiológico da cólera, ou seja, *Vibrio cholerae* foi a primeira espécie de *Vibrio* descoberta em 1854 pelo médico italiano Filippo Pacini (1812-1883) durante a terceira pandemia, enquanto estudava surtos da doença em Florença. Pacini descreveu o micro-organismo como parcialmente curvado semelhante a uma vírgula ou uma espiral, móvel em placas com ágar e como agente responsável pela cólera (THOMPSON; LIDA; SWINGS, 2004).

Os víbrios são bactérias heterotróficas Gram-negativas, em forma de bastonetes retos ou curvados, móveis por meio de um flagelo polar, podendo apresentar flagelos laterais em meios sólidos. São mesófilos, aeróbicos ou anaeróbicos facultativos, e são encontrados em *habitats* aquáticos e em associação com eucariontes. Eles geralmente são capazes de crescer em ágar marinho e sobre o meio seletivo ágar tiosulfato-citrato-bile-sacarose (TCBS) (STALEY *et al.*, 2005).

A grande maioria dos víbrios é halofílica, susceptível ao agente vibriostático O/129 (LAMBERT *et al.*, 1998) e positivo para as provas de: fermentação de glicose sem produção de gás, oxidase e catalase (NOGUEROLA; BLANCH, 2008). Todos utilizam o carbono como fonte de energia e ainda são capazes de produzir enzimas hidrolíticas como a amilase, gelatinase, caseinase, lecitinase, hemólise e DNase (MEJDI *et al.*, 2010).

Estes micro-organismos são autóctones de ambientes marinhos, costeiros e estuarinos, podendo habitar desde a coluna d'água até organismos ou sedimentos desses ecossistemas (EFESA, 2010; IGBINOSA; OKOH, 2008; ODI *et al.*, 2011; OKOH, 2008; PARANJPYE; STROM, 2005; THOMPSON; LIDA; SWINGS, 2004). Entretanto, podem ser também encontrados em ambientes de água doce (SHEHANE; SIZEMORE, 2002). Por terem capacidade de sobreviver e se multiplicar em águas contaminadas, com elevada salinidade e

com uma ampla faixa de temperatura e pH, variando de 10 a 30 °C e de 6,5 a 9,0, respectivamente, possuem uma ampla distribuição geográfica, sendo encontrados no mundo inteiro (MURRAY, 2004).

Vibriões são abundantes em ambientes marinhos e estuarinos (EFESA, 2010), porém são patógenos oportunistas e geralmente são associados a surtos de infecções ligado ao consumo de alimentos e água contaminados por fezes humanas ou esgoto, pescado crus ou mal cozidos, e em lesões na pele exposta a ambientes aquáticos e animais marinhos (LEE; YOUNGER, 2002).

Dentre os diversos *habitats* existentes, os víbrios podem ser isolados de amostras de ostras (CHATZIDAKI-LIVANIS *et al.*, 2006), camarões (MENDES *et al.*, 2009), mexilhões (PEREIRA, 2002), peixes (TORANZO; MAGARIÑOS; ROMALDE, 2005), corais (BEN-HAIM *et al.*, 2003) bem como em plâncton, água (IGBINOSA; OBI; OKOH, 2009) e sedimento (VIEIRA *et al.*, 2010a), sendo muitas vezes classificados como patógenos oportunistas.

Infecções causadas por víbrios, especialmente por *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* ou *V. vulnificus* são ocasionadas pelo consumo de moluscos mal cozidos ou crus, principalmente as ostras, ou até mesmo exposição à água contaminada (DALSGAARD, 1998; MORRIS JR, 2003). Essas incidências podem ser agravadas no verão por conta do comportamento sazonal do gênero, cuja maioria das espécies é mesófila e aumenta em número durante a estação (COLWELL, 2006).

Até o momento são conhecidas 105 (cento e cinco) espécies de víbrios pertencentes à família Vibrionaceae (DSMZ, 2012), destas pelo menos onze (11) espécies (*V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. cincinnatiensis*, *V. damsela*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. hollisae*, *V. metschnikovii*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*) são patogênicas ao homem ocasionando enfermidades como gastroenterites, bacteremias, otites, infecções em ferimentos externos e meningites (DALSGAARD, 1998; IGBINOSA; OBI; OKOH, 2009; IGBINOSA; OKOH, 2008; MORRIS JR, 2003; MURRAY, 2004).

Contudo, apesar de serem reconhecidos como patógenos ao homem e animais, os víbrios desempenham uma importante função na ciclagem de nutrientes dos ambientes aquáticos, assim preservando a maior parte dos nutrientes necessários para a sustentabilidade natural desses ecossistemas (THOMPSON; LIDA; SWINGS, 2004).

### 3.3.2.1 Principais espécies de *Vibrio* que ocorrem em águas costeiras e em bivalves

#### 3.3.2.1.1 *Vibrio alginolyticus*

Assim como todas as espécies pertencentes à família Vibrionaceae, *V. alginolyticus* é um bastonete Gram-negativo, halófilo restrito e mesófilo, podendo crescer em temperatura variando de 4 a 40 °C. Apresenta positividade para os testes de oxidase, catalase, indol, Voges-Proskauer, nitrato e gelatinase e negatividade para ONPG, luminescência e urease (NOGUEROLA; BLANCH, 2008).

*V. alginolyticus* pode ocasionar infecções nos ouvidos e em feridas abertas, através do contato com água contaminada (REYES-VELÁZQUEZ *et al.*, 2010). Segundo Lafisca *et al.* (2008), *V. alginolyticus* é capaz de sintetizar três (3) enzimas (colagenase, elastase e condroitinase), responsáveis pelo desencadeamento de infecções dermatológicas em humanos.

#### 3.3.2.1.2 *Vibrio cholerae*

*V. cholerae* é uma bactéria em forma de bastonete curvado Gram-negativo, sendo móvel por meio de um flagelo polar único, anaeróbica facultativa. Diferentemente da grande maioria dos *Vibrio* spp., que são halofílicos restritos, *V. cholerae* não necessita de sal para o seu desenvolvimento. É a espécie mais estudada da família Vibrionaceae e é o agente etiológico da cólera humana (CAMPOS; FERREIRA, 2008).

A cólera é transmitida por água contaminada, e também está associada ao consumo de alimentos. Na América, *V. cholerae* foi transmitido pelo consumo de mariscos e vegetais crus. A contaminação dessas duas fontes de alimentos é decorrente dos lançamentos de esgotos não tratados nos afluentes. Desde 1817, a cólera varreu o mundo em sete (7) pandemias (MADIGAN *et al.* 2010b). *V. cholerae* é subdividido em sorogrupos, de acordo com a reação do antígeno somático presente na bactéria. *V. cholerae* O1 e O139 são responsáveis por causar a cólera do tipo clássica, que pode ocorrer em epidemias ou pandemias mundiais (MURRAY; ROSENTHAL; PFAÜER, 2006).

#### 3.3.2.1.3 *Vibrio coralliilyticus*

Foi elucidada pela primeira vez por Ben-Haim *et al.* (2003), que estudava seis (6) estirpes classificadas até então como *Vibrio* spp. provenientes de quatro (4) espécies doentes

de corais (*Pocillopora damicornis*) do Oceano Índico e Mar Vermelho, uma (1) larva doente de ostras (*C. gigas*) do Reino Unido e de uma (1) larva de bivalves (*Nodipecten nodosus*) do Brasil. Segundo os autores, *V. coralliilyticus* é patogênico em corais apenas em temperaturas da água acima de 25 °C, e durante o inverno, quando as temperaturas baixam, provavelmente colonizam diferentes hospedeiros como larvas de bivalves.

São bactérias Gram-negativas em forma de bastonetes, móveis por um (1) único flagelo polar, não formadoras de esporos. São halofílicas restritas, apresentam crescimento entre 1 e 7% NaCl, não crescendo em concentrações de NaCl  $\geq 8$ . Apresentam positividade para os testes de oxidase, catalase, indol, b-glicosidase, b-galactosidase e gelatinase e negatividade para uréase. Produzem ácido a partir da glicose e reduzem nitrato a nitrito (BEN-HAIM *et al.*, 2003; NOGUEROLA; BLANCH, 2008).

#### 3.3.2.1.4 *Vibrio harveyi*

É uma bactéria Gram-negativa halofílica, com capacidade de sintetizar dez (10) diferentes enzimas que degradam a quitina, sendo este polissacarídeo o principal elemento das carapaças de crustáceos e conchas de moluscos. Assim fica evidente o principal motivo da difusão de *V. harveyi* em ambientes aquáticos costeiros (THOMPSON, 2004). *V. harveyi* antes de pertencer ao gênero *Vibrio* já foi classificado como *Achromobacter harveyi*, *Lucibacterium harveyi* e *Beneckea harveyi* (FARMER III *et al.*, 2005).

Dentre os membros pertencentes à família Vibrionaceae, *V. harveyi* se destaca por ocasionar surtos de doenças em organismos aquáticos cultivados. Os maiores prejuízos causados por *V. harveyi* são na carcinicultura (AUSTIN; ZHANG, 2006), na piscicultura (AUSTIN; ZHANG, 2006; QI *et al.*, 2009) e na malacocultura (PASS; DYBDAHL; MANNION, 1987).

#### 3.3.2.1.5 *Vibrio metschnikovii*

Bastonete Gram-negativo curto reto ou curvado, ocorrendo isoladamente, halófilo restrito. Móvel por meio de um único flagelo polar (NOGUEROLA; BLANCH, 2008). Diferentemente dos demais membros das Vibrionaceae, *V. metschnikovii* é incapaz de produzir citocromo oxidase e de reduzir nitrato (CAO *et al.*, 2010). Amplamente distribuídos por todo o ambiente aquático, principalmente em rios, estuários, esgotos, podendo ser isolado

de intestinos de animais, incluindo o de seres humanos. São frequentemente isolados de peixes, crustáceos e ostras (LEE; DONOVAN; FURNISS, 1978; MATTÉ *et al.*, 2007).

*V. metschnikovii* possui uma alta atividade hemolítica como fator de virulência, sendo relatado em situações raras como responsável por infecções humanas, tais como diarreia, colecistite e septicemia (LINDE *et al.*, 2004; MATTÉ *et al.*, 2007).

#### 3.3.2.1.6 *Vibrio mimicus*

*V. mimicus* foi descoberto por Davis *et al.* (1981) após realizar testes bioquímicos, sorológicos, suscetibilidade a antibióticos e de ácido desoxirribonucleico (DNA) em cepas bioquimicamente atípicas de *V. cholerae*. *V. mimicus* pode ser isolado a partir de marisco e água, bem como a partir de fezes diarreicas e infecções do ouvido em humanos. É uma bactéria Gram-negativa, oxidase positiva, apresenta reação negativa para fermentação da sacarose, Voges-Proskauer, lipase (10% positiva), sendo estes testes os principais para diferenciar *V. mimicus* de *V. cholerae* (DAVIS *et al.*, 1981).

*V. mimicus* é capaz de produzir múltiplas enterotoxinas (termo-lábil, termo-estável, cólera-like toxina, a hemolisina termoestável direta e citotoxina), além de possuir uma grande semelhança com *V. cholerae* (MIZUNO *et al.*, 2009; RAMAMURTHY *et al.*, 1994).

*V. mimicus* habitam naturalmente ecossistemas aquáticos (ALAM *et al.*, 1996), o contato primário com a água pode ocasionar otite, e o consumo principalmente de ostras cruas pode gerar quadros de diarreia aquosa, náuseas, vômitos e cólicas abdominais, cefaléia, febre, desidratação grave e diarreia sanguinolenta (CAMPOS *et al.*, 1996; SHANDERA *et al.*, 1983).

Hasan *et al.* (2010) detectaram a presença de regiões de virulência de *V. cholerae* (VPI, CTX $\Phi$ , VSP-II, MSHA, hlyA, pilha, e Int14) no *V. mimicus*, e uma grande similaridade dessas regiões, que indicavam recentes transferências interespecíes, e que estas transferências são um processo contínuo. Esta situação ajudaria a explicar como uma bactéria de vida livre, ambiental pode emergir como um patógeno humano.

#### 3.3.2.1.7 *Vibrio parahaemolyticus*

*V. parahaemolyticus* é uma bactéria Gram-negativa, halofílica (CHENG-SUA; CHENGCHU, 2007; LEAL *et al.*, 2008), distribuída em ambientes aquáticos, como mar, estuários e rios de água doce (AMIRMOZAFARI; FOROHESH; HALAKOO, 2005; CHAO

*et al.*, 2009; IGBINOSA; OKOH, 2008), e em sedimentos do fundo desses corpos d'água (CHANGA *et al.*, 2011), podendo colonizar peixes (NOORLIS *et al.*, 2011), camarões (TYAGI *et al.*, 2008) e ostras, contudo é considerada uma bactéria zoonótica, que oferece risco a saúde de pessoas que consomem pescados crus (MERWAD; EL-GHAREEB; TAISIR, 2011) ou cozidos (CHAO *et al.*, 2009).

Consumo de frutos do mar crus ou mal cozidos contaminados com *V. parahaemolyticus* pode levar ao desenvolvimento de gastroenterite aguda, caracterizada por diarreia, cefaléia, vômitos, náuseas e cólicas abdominais. Este patógeno é o principal causador de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) em muitos países asiáticos, incluindo China, Japão e Taiwan (CHENG-SUA; CHENGCHU, 2007). Nos Estados Unidos esse agente etiológico é responsável por gastroenterite associada ao consumo de marisco, principalmente, à ostra crua (MCLAUGHLIN *et al.*, 2005).

Conforme alguns estudos (CHAO *et al.*, 2009; RAMAMURTHY *et al.*, 1994; TYAGI *et al.*, 2008; WARD; BEJ, 2006), o *V. parahaemolyticus* atua como patógeno em humanos decorrente da síntese de uma ou duas toxinas, a hemolisina direta termoestável (TDH) e a hemolisina direta relacionada (TRH), codificadas pelos genes *tdh* e *trh*, respectivamente, e são conhecidas como os maiores fatores de virulência desse micro-organismo. Merwad, El-Ghareeb e Taisir (2011) isolaram a espécie das fezes de pessoas com diarreia, decorrente do consumo de moluscos mal cozidos, porém, frutos do mar cozidos foram responsáveis por surtos de intoxicação alimentar na China (CHAO *et al.*, 2009).

#### 3.3.2.1.8 *Vibrio pectenicida*

*V. pectenicida* foi elucidado pela primeira vez na literatura no trabalho de Lambert *et al.* (1998), estudando cinco (5) cepas relacionadas a surtos de doença em cultivos de larvas de vieira (*Pecten maximus*) na costa atlântica francesa (Bretanha).

A espécie de *V. pectenicida* é caracterizada por células Gram-negativas anaeróbicas facultativas, em forma de bastonetes móveis por meio de um único flagelo polar em líquido e flagelos laterais em meios sólidos. Dentre os principais testes bioquímicos, os que apresentam positividade são: fermentação da glicose, oxidase, catalase, redução de nitrato, amilase, gelatinase, desoxirribonuclease, crescimento de 18 e 22 °C, na presença de 1, 3 e 6% de NaCl e tendo resposta negativa para os seguintes testes: produção de gás a partir da glicose, indol, Voges-Proskauer, dihidrolase da arginina, descarboxilase da lisina e ornitina, hidrólise de ONPG e crescimento na presença de 0 e 8% de NaCl (LAMBERT *et al.*, 1998).

#### 3.3.2.1.9 *Vibrio ruber*

A descoberta de *V. ruber* foi realizada a partir de um estudo com 40 (quarenta) cepas de bactérias produtoras de gás, pertencente à família Vibrionaceae, isoladas de amostras de água do mar das regiões rasas do litoral de Keelung, Taiwan. No entanto, a redução de nitrato em nitrito, a capacidade de utilizar D-arabinose, melibiose e L-glicina como únicas fontes de carbono, a incapacidade de utilizar o sorbitol como única fonte de carbono, a resistência ao O/129 e susceptibilidade à eritromicina e novobiocina permitiu distingui-lo do *V. gazogenes* (SHIEH *et al.*, 2003).

*V. ruber* é um micro-organismo anaeróbico facultativo na forma de bacilo curvo Gram-negativo, móvel por meio de um flagelo polar. A espécie é halofílica crescendo em meios com 1 a 10% NaCl, em pH na faixa de 5 a 9, e em temperaturas de 20 a 40 °C, porém tem melhor desempenho em meios com 2% de NaCl e pH 7, incubado de 25 a 30 °C. Fermenta glicose e outros carboidratos com a produção de ácidos e gases, é positivo no teste de catalase e negativo para oxidase. Tem como *habitat* primário as águas costeiras (SHIEH *et al.*, 2003).

#### 3.3.2.1.10 *Vibrio tasmaniensis*

*V. tasmaniensis* foi proposto a partir do estudo de estirpes isoladas de salmão (*Salmo salar*) na Tasmânia, Austrália. A espécie é caracterizada como uma célula ligeiramente curvada, que possui metabolismo anaeróbico facultativo com capacidade de fermentar glicose, manitol e amigdalina, mas não inositol, sorbitol, ramnose, sacarose, arabinose e melibiose. Seu crescimento ocorre de 4 a 35 °C. Não cresce na ausência de NaCl ou em meios com  $\geq 8\%$  de NaCl. Tem positividade para os testes de oxidase, catalase, triptofano deaminase, indol, redução de nitrato e Voges-Proskauer (THOMPSON; THOMPSON; SWINGS, 2003).

#### 3.3.2.1.11 *Vibrio vulnificus*

É caracterizado como um bastonete curvo Gram-negativo, halófilo e quando móvel possui um único flagelo polar. A espécie pode ser encontrada em águas salgadas ou salobras de regiões tropicais, podendo apresentar vida livre no ambiente e/ou associado a parasitas de

animais, tais como moluscos, peixes, crustáceos e mamíferos, incluindo seres humanos (VASEEHARAN; RAMASAMY, 2003).

Na atividade da maricultura, o *V. vulnificus* figura como importante patógeno para humanos com capacidade de invadir o sistema circulatório causando septicemia (IGBINOSA; OKOH, 2008; MARUO *et al.*, 1998, PARANJPYE; STROM, 2005).

*V. vulnificus* é dividido em três (3) biótipos (B1, B2 e B3). Os biótipos 1 e 3 têm uma estreita relação à doenças humanas, decorrentes de manipulação ou consumo de mariscos crus (BISHARAT *et al.*, 2007). O biótipo 2 atua como patógeno natural de enguias, no entanto, também pode atuar como patógeno em humanos em menor escala (AMARO; BIOSCA, 1996) ou em peixes quando estes, por sua vez, são cultivados na presença de enguias (FOUZ *et al.*, 2002).

### **3.4 Antimicrobianos no ambiente aquático**

O homem compartilha espaço com os micro-organismos desde seu surgimento, e essa convivência em muitos momentos causou à humanidade inúmeras doenças. Contudo, as causas dessas doenças só foram descobertas através dos estudos de Pasteur e Koch e de seus sucessores, que comprovaram a teoria da biogênese, e dos micro-organismos como responsáveis pela grande maioria das enfermidades (DEPIZZOL, 2006).

O conhecimento das enfermidades de origem infecciosas deu origem, no século XIX, a diversos estudos na busca de tratamentos terapêuticos, e foi no início do século XX, que surgiram os primeiros quimioterápicos de ação sistêmica. A descoberta de drogas capazes de fazer ligações a receptores específicos na célula sensível, com ação seletiva da droga sobre o agente agressor, em doses toleradas pelo organismo do hospedeiro agredido, deu origem aos primeiros antibióticos (TAVARES, 2007).

Antimicrobiano ou agente antimicrobiano são produtos químicos de origem natural ou sintética, com ação deletéria ou inibitória de crescimento de micro-organismos. Os agentes antimicrobianos podem atuar sobre bactérias, fungos e vírus, porém sua ação pode ser diferenciada pela atuação nos micro-organismos. Aqueles cuja função é deletéria são nomeados de agentes “cidas”, e os que inibem o crescimento são chamados de agentes “státicos”. Assim dependendo do micro-organismo e da função do antimicrobiano, estes fármacos podem ser nomeados de bacteriostático, fungistático e viristático ou bactericida, fungicida e viricida (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

Segundo Fonseca (1991) e Tavares (2001) antibióticos são substâncias produzidas por micro-organismos capazes de agir com toxicidade seletiva sobre outros micro-organismos, e quando empregados na profilaxia, em pequenas concentrações, não causam danos ao organismo infectado. Alterthum (2008b) considera antibióticos substâncias produzidas por seres vivos utilizadas no tratamento de infecções. Entretanto alguns antibióticos podem ser melhorados em laboratórios, e estes são chamados antibióticos semi-sintéticos.

Alterthum (2008b) denomina de quimioterápicos as substâncias sintetizadas em laboratório utilizadas na profilaxia de infecções, de modo que apresentem baixa toxicidade para as células do hospedeiro e alta ao agente infectante. Entretanto, Paiva Neto (1989) e Tavares (2001) nomeiam de quimioterápica toda substância de origem sintética ou vegetal utilizada no tratamento de infecções. Nesse sentido, os autores convergem quando consideram que os antimicrobianos são substâncias de origem sintética ou natural no combate à infecção.

Os antimicrobianos podem ser classificados de várias maneiras, considerando seu espectro de ação (antifúngicos, anaerobicidas, Gram-positivos, Gram-negativos, amplo espectro), o tipo de atividade antimicrobiana (bactericida e bacteriostático), o grupo químico ao qual pertencem (aminoácidos, açúcares, acetatos e quimioterápicos) e o mecanismo de ação (síntese da parede celular, permeabilidade de membrana, síntese protéica e ácidos nucleicos) (ALTERTHUM, 2008b; PAIVA NETO, 1989). No entanto, a organização por classes, baseando-se na estrutura química do antimicrobiano, é a mais usada na literatura (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Segundo Depizzol (2006), desde sua descoberta os antimicrobianos proporcionaram um novo quadro mundial no controle das doenças infecciosas, principalmente as de origem bacteriana, e a utilização desses ultrapassaram não apenas as enfermidades humanas, mas também a produção animal.

Segundo Alterthum (2008a), os antimicrobianos não produzem estirpes resistentes, mas exercem uma pressão seletiva sobre os indivíduos. O mesmo autor expõe a resistência bacteriana como um mecanismo de alteração genética expressa bioquimicamente, podendo ocorrer tanto por mutações cromossômicas como pela aquisição de plasmídios de resistência ou por *transposons*.

Segundo Holmstrom *et al.* (2003) a inserção de antimicrobianos na aquicultura pode causar a seleção de cepas bacterianas resistentes entre os patógenos que infectam os animais cultivados e seres humanos. No entanto, esta atividade é comum na aquicultura mundial na prevenção ou no tratamento dos surtos de doenças.

No Brasil, o uso de antimicrobianos para o tratamento e prevenção de doenças em animais está preconizado na Instrução Normativa nº 42, de 1999, que estabelece que a tetraciclina, eritromicina e a oxitetraciclina são os antimicrobianos mais indicados para a piscicultura. Na carcinicultura os mesmos são usados como medida profilática, bem como nas doenças determinadas por bactérias piscicríficas e na septicemia hemorrágica causada por *Pseudomonas*, *Edwardsiella* e *Aeromonas* (BRASIL, 1999).

Ainda que o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) permita o uso de antimicrobianos na aquicultura, alguns como cloranfenicol e nitrofuranos são estritamente proibidos, devido à alta toxicidade dessas duas drogas (BRASIL, 2003).

A utilização indiscriminada de antimicrobianos pode ter um grande impacto sobre a microbiota de ecossistemas aquáticos, podendo atuar como selecionador de cepas resistentes (ZENG *et al.*, 2010; ZHANG; ZHANG; FANG, 2009). É comum o relato em trabalhos de um grande número de cepas bacterianas resistentes aos antimicrobianos de uso clínico humano ou veterinário, em atividades de maricultura (DANG *et al.*, 2006; REBOUÇAS *et al.*, 2011).

Em muitos trabalhos tem se verificado a resistência de *Vibrio* spp. frente aos antimicrobianos anteriormente eficazes (COSTA *et al.*, 2006; LIMA *et al.*, 2005; REBOUÇAS *et al.*, 2011). Em uma pesquisa de susceptibilidade a 5 (cinco) antimicrobianos em 92 (noventa e duas) cepas de *Vibrio* spp. procedentes de diferentes fontes (produtos da pesca, frutos do mar, a água do mar e da aquicultura), Ferrini *et al.* (2008) constataram um alto percentual de resistência à ampicilina (82%), e em menor escala a sulfametoxazol (7%), tetraciclina (3%), e ao sulfametoxazol-trimetoprima (1%).

### **3.4.1 Principais classes de antimicrobianos**

#### **3.4.1.1 Aminoglicosídeos**

Os aminoglicosídeos atuam contra bacilos Gram-negativos principalmente contra membros da família Bacteriaceae, além de *Brucella*, *Yersinia pestis*, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa* e alguns cocos (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Neisseria gonorrhoeae*) (TAVARES, 2001), com ação bactericida sobre organismos sensíveis por interferir em sua síntese protéica e em alguns casos como bacteriostático (STROHL; ROUSE; FISHER, 2004).

A estreptomicina foi o primeiro representante da classe isolada a partir de um actinomiceto (*Streptomyces griseus*) e atua inibindo a iniciação da cadeia protéica.

Posteriormente, foram descobertos outros antibióticos com ação similar ao da estreptomicina, tais como a neomicina e a canamicina, isolados de culturas de bactérias do gênero *Streptomyces*, e a gentamicina, isolada de cultura de fungo (*Micromonospora* spp.) (TAVARES, 2001).

#### 3.4.1.2 Cefalosporinas

As cefalosporinas correspondem a uma classe de substâncias formada por antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, ou seja, possuem um componente estrutural chamado de anel  $\beta$ -lactâmico. Estes fármacos naturais são produzidos por espécies de fungos do gênero *Cephalosporium*. Dentro da classe, as de maior interesse clínico são as cefalosporinas semi-sintéticas, cujo espectro de ação é geralmente mais amplo, tendo uma maior resistência à ação enzimática das  $\beta$ -lactamases. As cefalosporinas atuam em enzimas específicas na síntese da parede celular das bactérias, sua importância clínica decorre da baixa toxicidade ao hospedeiro e do largo espectro de atividade (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

A classificação das cefalosporinas segue uma ordem cronológica chamadas de gerações. Existem até o momento quatro (4) gerações, a primeira geração (cefalotina, cefazolina, cefalexina, cefadroxil e cefadrina), segunda geração (cefotaxima, cefamandol, cefaclor, cefuroxima), terceira geração (ceftriaxona, cefotaxima, cefoperazona, ceftazidima, cefpodoxima e cefixima) e quarta geração (cefepima e cefpiroma) (STROHL; ROUSE; FISHER, 2004; TRABULSI; MIMICA; MIMICA, 2008).

As cefalosporinas de primeira geração são indicadas no tratamento de infecções causadas tanto por bactérias Gram-positivas como Gram-negativas, principalmente na profilaxia de infecções causadas por *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. A segunda geração é formada por antimicrobianos de amplo espectro de ação, atuando contra bactérias Gram-positivas e negativas (PAIVA NETO, 1989; TRABULSI; MIMICA; MIMICA, 2008), no entanto, esta geração é recomendada apenas no tratamento de infecções causadas por Gram-negativas (PRESCOTT, 2006).

As terceira e quarta gerações das cefalosporinas são antimicrobianos de largo espectro indicadas a infecções tanto por Gram-positivas como Gram-negativas, possuem grande estabilidade diante das  $\beta$ -lactamases, no entanto a principal diferença entre as duas gerações está relacionada à estabilidade das  $\beta$ -lactamases, onde a terceira não apresenta estabilidade diante de  $\beta$ -lactamases de origem plasmidial, enquanto a quarta é mais estável (TAVARES, 2007b).

### 3.4.1.3 Fenicóis

Os fenicóis são antibióticos de ação predominantemente bacteriostática por inibição da síntese protéica, possuem um amplo espectro de ação, tem como representantes da classe o cloranfenicol, tiafenicol e florfenicol. Os fenicóis podem atuar de duas formas, a primeira por fixação na fração 30S do ribossomo impedindo a ligação do RNA-mensageiro ao ribossomo, assim, competindo com o ácido nucléico, a segunda fixando na fração 50S do ribossomo inibindo a ação de peptidil-transferases e bloqueando a união do polipeptídeo (TAVARES, 2007c).

O cloranfenicol foi isolado pela primeira vez a partir da cultura de *Streptomyces venezuelae* (bactéria) em 1947. É considerado como antibiótico de amplo espectro de ação e possui como característica uma estabilidade que permite seu armazenamento em temperatura ambiente por um tempo bastante prolongado. O florfenicol é um derivado sintético fluorado de cloranfenicol, e assim como os fenicóis, possui atividades tanto contra bactérias Gram-positivas como Gram-negativas (LANG *et al.*, 2011; SCHWARZ *et al.*, 2004).

No entanto, a profilaxia com cloranfenicol causa danos à medula óssea resultando na anemia aplástica reversível ou permanente. A anemia aplástica reversível está relacionada com a dose, ocasionando uma redução significativa na produção de eritrócitos, leucócitos e plaquetas pela medula óssea, já na anemia aplástica permanente ocorre total destruição da medula óssea, sendo independente da dose. Assim, o cloranfenicol é considerado um antimicrobiano de última escolha (BLACK, 2002; JOHNSTON; SANTILLO, 2002).

### 3.4.1.4 Macrolídeos

Os antimicrobianos pertencentes à classe dos macrolídeos são caracterizados pela presença de um anel lactona macrocíclico em sua estrutura química e ao inibirem a síntese protéica podem ser bactericidas ou bacteriostáticos dependendo da dose. Na medicina veterinária tem uma forte importância, podendo ser destacada a eritromicina, tilosina e espiramicina (PAIVA NETO, 1989).

Dentro da classe dos macrolídeos a eritromicina é o antibiótico mais utilizado na medicina. Este antimicrobiano atua principalmente sobre Gram-positivas e cocos Gram-negativos, espiroquetas e alguns bacilos Gram-negativos. É indicada no tratamento de infecções ocasionadas por *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumoniae*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Bacillus*

*anthracis*, *Staphylococcus* (sensível a oxacilina), pneumococos (hospedeiro alérgicos a penicilina G) e estreptococos (TRABULSI; MIMICA; MIMICA, 2008).

#### 3.4.1.5 Monobactâmicos

Os monobactâmicos são a classe de antibióticos formada por  $\beta$ -lactâmicos que apresentavam uma estrutura monocíclica. O primeiro representante da classe foi descoberto em 1975, a partir da bactéria *Nocardia uniformis*, a nocardicina. No entanto, não apresenta importância clínica devido ao pequeno potencial antimicrobiano, porém com a descoberta do aztreonam em 1981, a classe do antibiótico passou a fazer parte do quadro de antimicrobianos utilizados na medicina. O aztreonam possui atividade apenas contra bactérias Gram-negativas, seu mecanismo de ação consiste em interferir na síntese da parede celular e causar lise bacteriana (TAVARES, 2007a).

#### 3.4.1.6 Nitrofuranos

Os nitrofuranos correspondem à classe de quimioterápicos derivados do nitrofural, que possuem um grupamento nitroso na posição 5. São muito utilizados na prática da medicina veterinária, principalmente devido às propriedades antibacterianas, antifúngicas e antiprotozoárias. O mecanismo de ação destes antimicrobianos decorre da inibição do metabolismo dos carboidratos em micro-organismos sensíveis (PAIVA NETO, 1989).

A nitrofurantoína tem ação contra bactérias Gram-positivas e negativas. Devido ao fato deste antimicrobiano ser concentrado na urina, quando administrado via oral, este por vez é recomendado principalmente no tratamento do trato urinário (TRABULSI; MIMICA; MIMICA, 2008).

#### 3.4.1.7 Penicilinas

A penicilina G (benzilpenicilina) foi o primeiro antibiótico  $\beta$ -lactâmico descoberto e produzido a partir do fungo *Penicillium chrysogenum*. Atua principalmente contra bactérias Gram-positivas, já que as Gram-negativas são impermeáveis a esse antibiótico, porém é sensível a  $\beta$ -lactamase, uma enzima produzida por algumas bactérias resistentes. No entanto, os semi-sintéticos derivados de penicilina G têm ação contra Gram-negativas (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004; STROHL; ROUSE; FISHER, 2004).

Dentre os antibióticos semi-sintéticos, a ampicilina tem espectro de ação amplo, pois possui resistência à  $\beta$ -lactamase. Atua contra infecções causadas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, devido às diferenças estruturais no grupo *N*-acetil, que permite o transporte deste antibiótico através da membrana externa das Gram-negativas, onde inibe a síntese da parede celular (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

#### 3.4.1.8 Quinolonas

As quinolonas são compostos antimicrobianos de origem sintética que interagem com o DNA girase bacteriano, atua como análogo ao fator de crescimento impedindo que a girase realize o superenovelamento do DNA bacteriano, necessário para o empacotamento do DNA na célula bacteriana. Como o DNA girase é encontrado em todas as bactérias, as quinolonas são utilizadas na profilaxia de infecções causadas por bactérias Gram-positivas e negativas (BLACK, 2002, MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004; STROHL; ROUSE; FISHER, 2004).

O ácido nalidíxico foi o primeiro representante das quinolonas. A ciprofloxacina é um dos antimicrobianos mais utilizados na medicina para tratar infecções do trato urinário e outras causadas por *Bacillus anthracis* resistente à penicilina G, e corresponde ainda a um derivado fluoroquinolona do ácido nalidíxico. As fluoroquinolona são utilizadas também na indústria frigorífica e avícola, e na prevenção de doenças respiratórias (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

#### 3.4.1.9 Sulfonamidas

Sulfonamidas (sulfas) são quimioterápicos de ação bacteriostática e foram um dos primeiros análogos de fatores de crescimento amplamente utilizados na inibição específica do crescimento bacteriano. Dentre as sulfas, a sulfanilamida é a mais simples, cujo mecanismo de ação atua como análogo ao ácido *p*-aminobenzóico, um componente da vitamina ácido fólico (BLACK, 2002; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

As sulfonamidas bloqueiam a síntese do ácido fólico nas bactérias, um precursor de ácidos nucleicos. Como as células dos animais superiores obtêm o seu ácido fólico da dieta, elas , ao contrário das bactérias que o sintetizam, não são prejudicadas. Diante desta situação, à princípio, as bactérias são incapazes de absorver o ácido fólico. No entanto, a

resistência bacteriana às sulfonamidas, decorreu por essas terem desenvolvido a capacidade de utilizar fontes exógenas de ácido fólico (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

#### 3.4.1.10 Tetraciclínas

As tetraciclínas formam a classe de antibiótico de ação geralmente bacteriostática com uma estrutura química policíclica naftacenocarboxamídica, e atuam na inibição da síntese protéica. O primeiro representante da classe foi descoberto em 1948, a clortetraciclina obtida a partir da cultura de uma bactéria chamada de *Streptomyces aureofaciens*. Posteriormente foi descoberta a oxitetraciclina isolada de *Streptomyces rimosus*. A tetraciclina é considerada um antibiótico semi-sintético, pois é resultante de modificações em laboratório da clortetraciclina (PAIVA NETO, 1989).

As tetraciclínas são consideradas antimicrobianos de largo espectro, embora a resistência entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas tenha se mostrado muito frequente. A principal característica desses antimicrobianos é a capacidade de difusão no interior das células do hospedeiro, o que permite sua utilização em patógenos intracelulares (TRABULSI; MIMICA; MIMICA, 2008).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

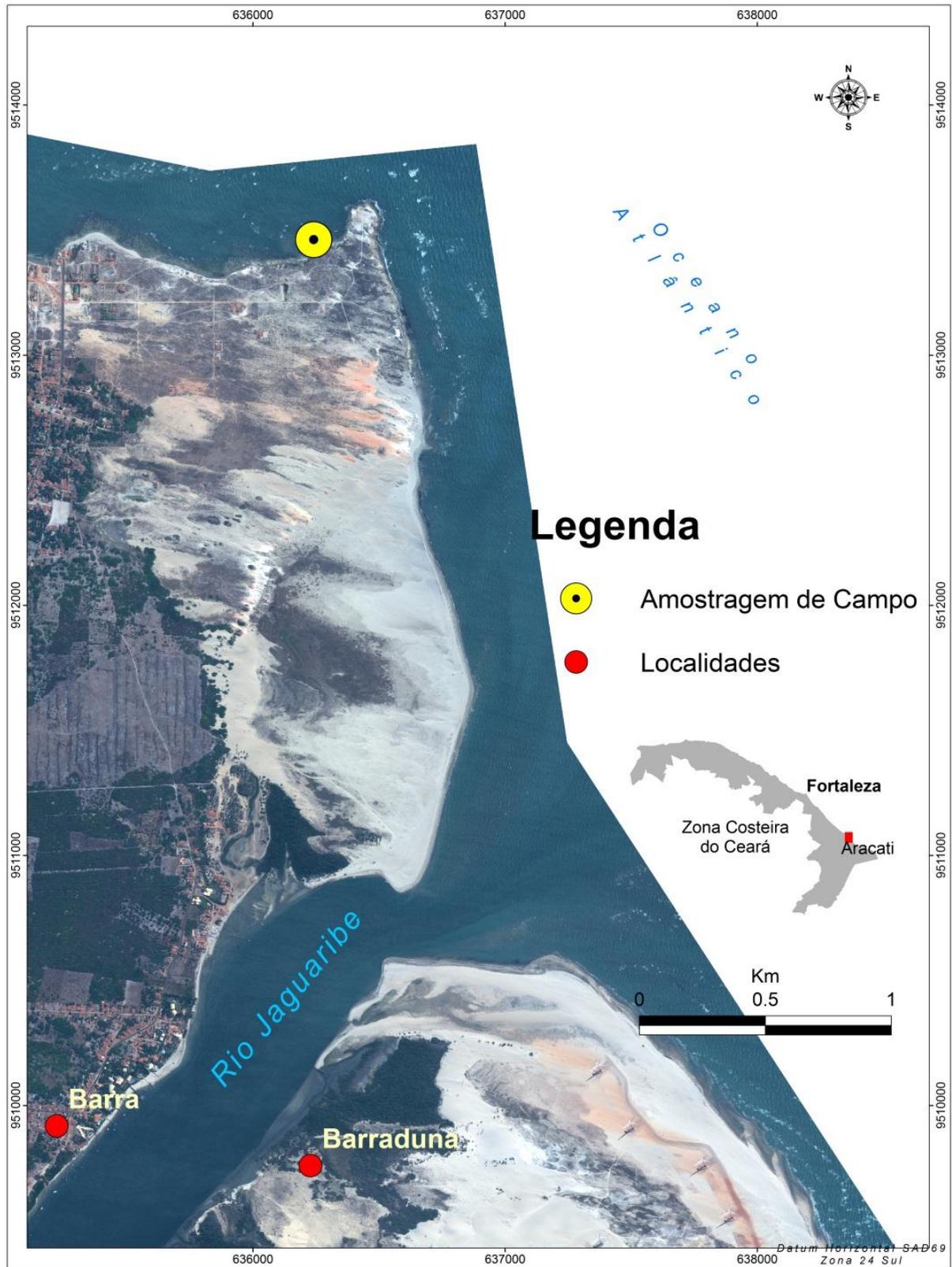
### 4.1 Descrição da área

As coletas foram realizadas no estuário do rio Jaguaribe (04°24'03,7"S; 037°46'29,9"W), no Pontal de Maceió em Fortim – Ceará, em uma área onde existe uma estrutura de cultivo e bancos naturais de ostra (*Crassostrea rhizophorae*) (FIGURA 1).

A bacia hidrográfica do rio Jaguaribe está inserida na zona de domínio do clima semi-árido caracterizado pela existência de dois períodos: estio e chuvoso (MARINS; PAULA FILHO; ROCHA, 2007), e ocupa uma área de 74.621 km<sup>2</sup>, quase 48% do território cearense, e é subdividida em cinco sub-bacias: Salgado, Alto Jaguaribe, Médio Jaguaribe, Baixo Jaguaribe e Banabuiú (GONDIM, *et al.*2004).

A região do Baixo Jaguaribe é caracterizada pela intensa prática da carcinicultura (FIGUEIRÊDO *et al.*, 2006) e da agricultura irrigada (MILHOME *et al.*, 2009). Essas duas atividades apresentam-se intensificadas nessa região do Estado do Ceará, e contribui com a poluição do rio Jaguaribe, por matéria orgânica e produtos químicos, em consequência da utilização intensiva de ração e insumos químicos na carcinicultura nas etapas de aclimatização, engorda e despesca (FIGUEIRÊDO *et al.*, 2006), assim como da utilização de fertilizantes e agrotóxicos na agricultura irrigada (MILHOME *et al.*, 2009).

Figura 1 – Localização da área de coleta das ostras (*Crassostrea rhizophorae*) selvagens e cultivadas na região do rio Jaguaribe (Pontal do Maceió em Fortim – Ceará)



## 4.2 Coletas

Foram realizadas dez (10) coletas, sendo metade delas no período de estio (outubro, novembro, dezembro de 2010) e a outra, no período chuvoso (janeiro, fevereiro, março de 2011). Todas as coletas aconteceram no período de baixa-mar e com frequência quinzenal. Em cada amostragem eram extraídos de 15 (quinze) a 20 (vinte) ostras da estrutura de cultivo e do banco natural, que eram transportadas, separadamente por origem, em recipientes esterilizados e acondicionados sob refrigeração em caixa isotérmica até o Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará.

Também foram coletadas amostras de água dos locais de coleta usando frascos de vidro âmbar esterilizados, que foram acondicionados em caixas isotérmicas e transportadas até o laboratório.

## 4.3 Análises

### 4.3.1 Análises físico-químicas

#### 4.3.1.1 Água

No momento da coleta foi mensurada a temperatura das amostras de água do entorno dos pontos de coleta com auxílio de um termômetro (Incoterm). A salinidade e pH (potencial hidrogeniônico) foram determinados no laboratório utilizando, respectivamente, um refratômetro portátil (Biobrix 211 BP) e um potenciômetro modelo 211 (Hanna instruments).

#### 4.3.1.2 Ostras

No laboratório, as ostras foram lavadas em água potável corrente e abertas assepticamente. Tecido e líquido intervalvar das ostras foram retirados e colocados em recipientes separados (beckers esterilizados) formando duas amostras para cada grupo de ostras (selvagens e cultivadas). Foram determinados: o tamanho das conchas com auxílio de um paquímetro digital (Digit), o peso total do tecido em uma balança analítica (Ohaus), volume total de líquido intervalvar em uma proveta com capacidade de 25 mL. O pH das

amostras de líquido intervalvar foi medido diretamente com o potenciômetro, enquanto as amostras de tecido foram homogeneizadas por maceração em um almofariz com auxílio de um pistilo, antes da medição.

### **4.3.2 Análises Microbiológicas**

#### *4.3.2.1 Processamento e diluição das amostras*

As amostras de água e líquido intervalvar foram diluídas na proporção de 1:9 (volume de amostra/diluyente) que correspondeu à diluição  $10^{-1}$ . A partir desta foram feitas diluições seriadas até  $10^{-5}$ .

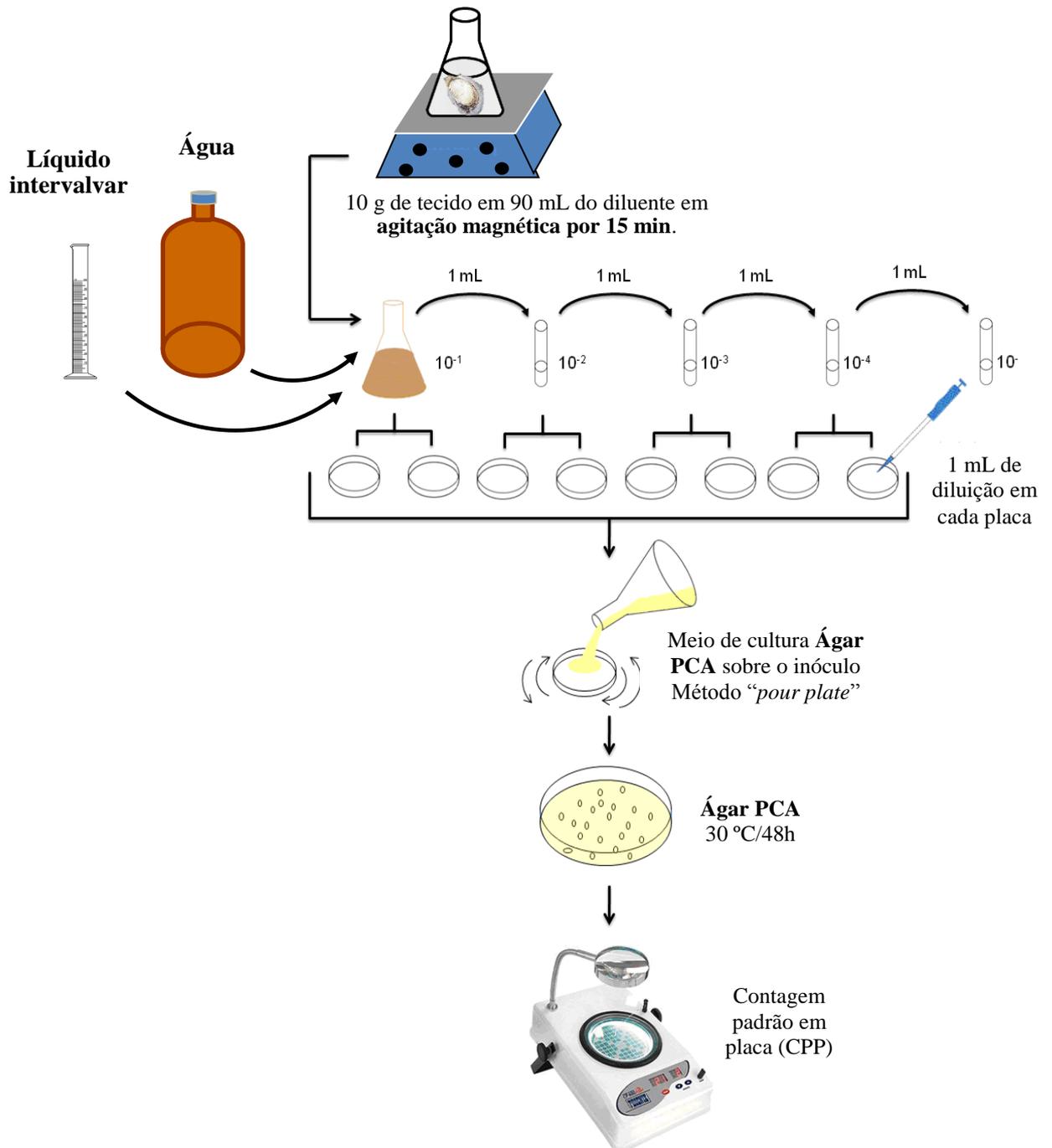
Dez gramas do macerado de tecidos foi homogeneizado com 90 mL de diluyente esterilizado. A homogeneização correspondeu à diluição  $10^{-1}$ . Foram feitas diluições seriadas até a  $10^{-5}$ .

Em todas as amostras foram utilizados dois diluyentes: água do mar com salinidade ajustada para 20 para quantificação de BHC e salina a 1% de NaCl para víbrios.

#### *4.3.2.2 Contagem de bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC)*

A quantificação da população microbiana heterotrófica cultivável foi realizada a partir do plaqueamento em meio plate count agar (PCA) pela técnica de *pour plate* (URURAHY, 1998) utilizando a água do mar ajustada na salinidade 20 como diluyente. Para tanto foi derramada uma alíquota de 1 mL das diluições em cada placa e 15 mL do meio de cultura a 45 °C sobre a alíquota. Esse procedimento foi feito em duplicata. Após a incubação, por 48 horas a 30 °C foi feito a contagem do número em unidades formadoras de colônias (resultados expressos em UFC/g de tecido muscular e UFC/mL de líquido intervalvar e de água) (FIGURA 2).

Figura 2 – Etapas do processamento das amostras de água da área de coleta, do tecido e líquido intervalvar das ostras cultivadas e selvagens coletadas no estuário do rio Jaguaribe, Ceará, para contagem de bactérias heterotróficas cultiváveis

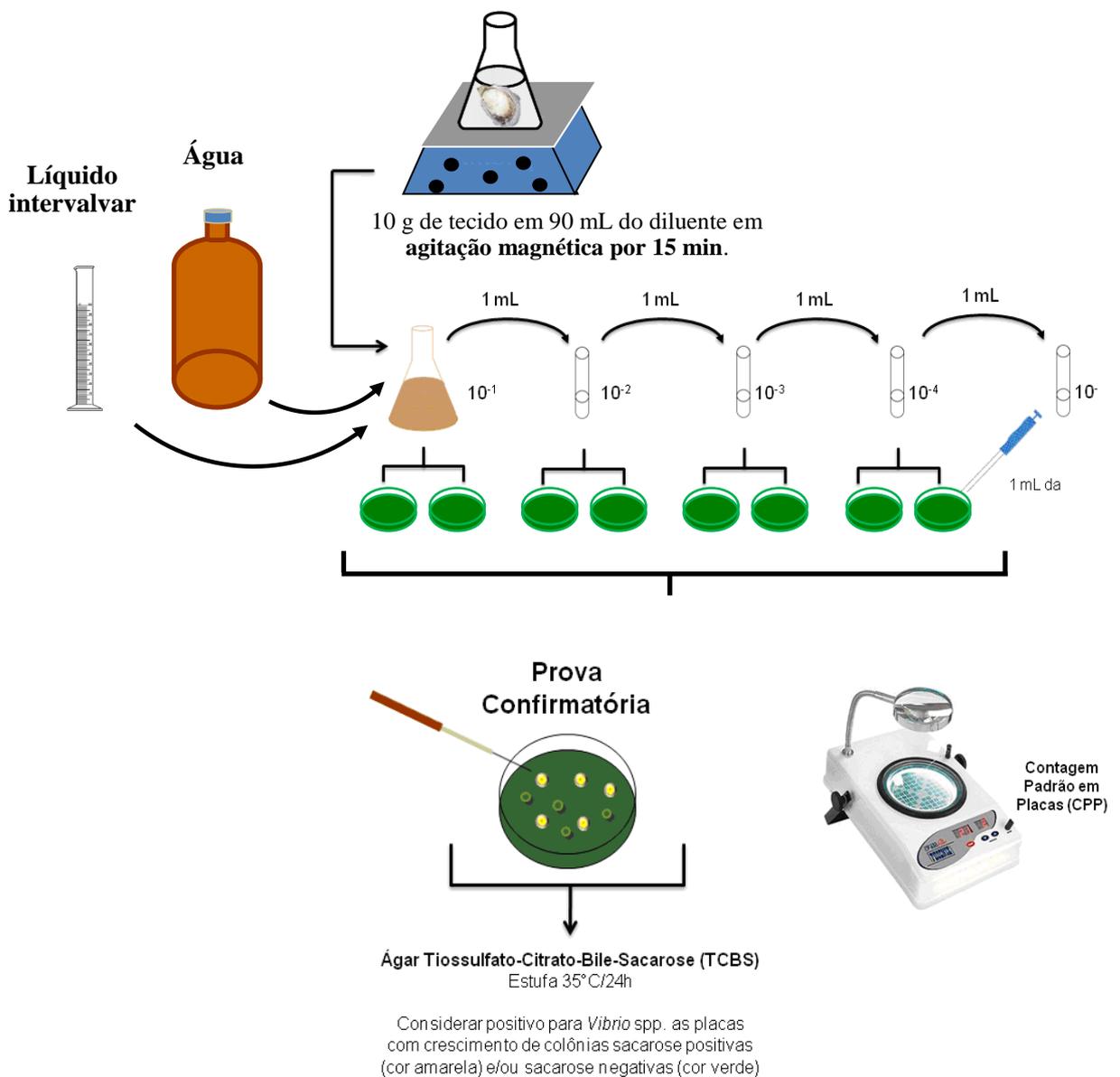


#### 4.3.2.3 Contagem de vibrios

De cada diluição em salina (1% de NaCl) foi tomada uma alíquota de 0,2 mL e inoculada em placas do meio ágar TCBS através da técnica de *spread plate* com auxílio de uma alça de Drigalski e incubadas a 35 °C por 18 horas. Sobre a superfície do meio foram

contadas, separadamente, as colônias sacarose positivas e negativas respeitando o intervalo de 25 (vinte e cinco) a 250 (duzentas e cinquenta) colônias em cada placa (DOWNES; ITO, 2001). O procedimento foi realizado em duplicata. As colônias com características de sacarose positivas e negativas foram isoladas das placas, quando possível foram isoladas duas (2) de cada colônia, por tipo de amostra e origem (FIGURA 3). Foram isoladas ao todo 133 cepas.

Figura 3 – Etapas do processamento das amostras de água da área de coleta, do tecido e líquido intervalvar das ostras cultivadas e selvagens coletadas no estuário do rio Jaguaribe, Ceará, para contagem de vibrios



#### 4.3.2.4 Identificação bioquímica das BHC

Das colônias crescidas sobre o meio ágar PCA foram isoladas quatro (4) de cada tipo de amostra e origem, totalizando 240 (duzentos e quarentas) cepas. Foram feitos repiques do material sobre ágar triptona soja (TSA) contendo 1% de NaCl, com incubação em estufa a 35°C por 24 horas. As culturas foram submetidas à coloração de Gram.

Na identificação das culturas puras foram realizadas as seguintes provas bioquímicas propostas por Bernardes *et al.* (2003), Koneman *et al.* (2006), Lelliott, Stead (1987), Marchand Pajares (2002), Menezes, Neufeld (2006), Murray *et al.* (2005), Noguerola, Blanch (2008), Oplustil *et al.* (2004), Silva e Almeida (2006) e pelo manual de Bergey's (STALEY *et al.*, 2005): oxidação da glicose; fermentação da glicose; oxidase; catalase; motilidade; produção de indol, sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), fenilalanina desaminase; descarboxilação dos aminoácidos lisina e ornitina; hidrólise da arginina; redução de nitrato; crescimento em 0% de NaCl a 35 °C; crescimento em meio Mac Conkey e em TCBS; gelatinase, produção de pigmento amarelo, pioverdina e de piocianina, gás em glicose, fermentação de carboidratos (arabinose, glicose, glucosamina, inositol, maltose, manitol, manose, melibiose, xilose, inositol, sacarose e sorbitol), urease, tolerância ao NaCl 0%, 3%, 5%, 6%, 6,5%, 8% e 10%; crescimento a 4 e 42 °C; alfa-cetogluturato, crescimento em cianeto de potássio (KCN); produção de fluorescência; produção de esporos; susceptibilidade ao vibriostático O/ 129 10 µg e ampicilina 10 µg; hemólise, citrato, vermelho de metila, Voges-Proskauer, ONPG, DNase, lipase, hidrólise da esculina; hidrolisarem esculina em presença de bÍlis; coloração de Ziehl; reação de CAMP.

#### 4.3.2.5 Identificação bioquímica de *Vibrio* spp.

Após o isolamento e purificação das culturas, as estirpes foram submetidas a provas bioquímicas para a identificação fenotípica considerando as características morfotintoriais (técnica de Gram) e resposta a testes bioquímicos. Para a identificação das espécies do gênero *Vibrio* foi utilizado esquema proposto por Noguerola e Blanch (2008).

#### 4.3.2.6 Antibiograma

As cepas identificadas foram testadas frente a 18 (dezoito) antimicrobianos pertencentes a dez (10) classes distintas, a fim de estabelecer o perfil de susceptibilidade das

populações de BHC e de *Vibrio*, frente às drogas utilizadas tanto no tratamento de infecções humanas, como na medicina veterinária. Os agentes microbianos pertenciam às seguintes classes: aminoglicosídeos (estreptomicina, gentamicina); cefalosporinas (cefalotina, cefoxitina, cefotaxima, cefepima); fenicóis (cloranfenicol, florfenicol); macrolídeos (eritromicina) monobactâmicos (aztreonam); nitrofuranos (nitrofurantoína); penicilinas (ampicilina, penicilina G); quinolonas (ácido nalidíxico, ciprofloxacina); sulfonamidas (sulfazotrim); tetraciclina (tetraciclina, oxitetraciclina). O teste de antibiograma seguiu protocolos estabelecidos por CLSI (2010).

O antibiograma foi dividido em dois (2) grupos: o primeiro foi formado pelas cepas Gram-positivas pertencentes às BHC, e o segundo pelas cepas Gram-negativas compostas pela população de *Vibrio* e cerca da metade das BHC. Para cada grupo foram testados 12 (doze) antimicrobianos pertencentes a oito (8) classe para o primeiro (QUADRO 1) e sete (7) para o segundo grupo (QUADRO 2). Os antimicrobianos selecionados para o teste de susceptibilidade para as culturas bacterianas Gram-positivas foram: cefalotina; cefepima; cefotaxima; ciprofloxacina; cloranfenicol; eritromicina; florfenicol; nitrofurantoína; oxitetraciclina; penicilina G; sulfazotrim e tetraciclina; e para as Gram-negativas foram: o ácido nalidíxico; ampicilina; aztreonam; cefalotina; cefepima; cefotaxima; cefoxitina; cloranfenicol; estreptomicina; florfenicol; gentamicina e nitrofurantoína.

Quadro 1 – Interpretação dos halos de inibição para as cepas da população Gram-positiva das bactérias heterotróficas cultiváveis segundo o CLSI (2010)

| Classe                | Antimicrobianos | Sigla | Conc. Discos* | Zona de inibição (mm) |         |      |
|-----------------------|-----------------|-------|---------------|-----------------------|---------|------|
|                       |                 |       |               | R                     | I       | S    |
| <b>Cefalosporinas</b> | Cefalotina      | CFL   | 30 µg         | ≤ 14                  | 15 a 17 | ≥ 18 |
|                       | Cefepima        | CPM   | 30 µg         | ≤ 14                  | 15 a 17 | ≥ 18 |
|                       | Cefotaxima      | CTX   | 30 µg         | ≤ 14                  | 15 a 22 | ≥ 23 |
| <b>Fenicóis</b>       | Cloranfenicol   | CLO   | 30 µg         | ≤ 12                  | 13 a 17 | ≥ 18 |
|                       | Florfenicol     | FLF   | 30 µg         | ≤ 12                  | 13 a 17 | ≥ 18 |
| <b>Macrolídeos</b>    | Eritromicina    | ERI   | 15 µg         | ≤ 13                  | 14 a 20 | ≥ 21 |
| <b>Nitrofuranos</b>   | Nitrofurantoína | NIT   | 30 µg         | ≤ 14                  | 15 a 16 | ≥ 17 |
| <b>Penicilinas</b>    | Penicilina G    | PEN   | 10 U          | ≤ 14                  | –       | ≥ 15 |
| <b>Quinolonas</b>     | Ciprofloxacina  | CIP   | 5 µg          | ≤ 15                  | 16 a 20 | ≥ 21 |
| <b>Sulfonamidas</b>   | Sulfazotrim     | SUT   | 25 µg         | ≤ 10                  | 11 a 15 | ≥ 16 |
| <b>Tetraciclina</b>   | Oxitetraciclina | OTC   | 30 µg         | ≤ 14                  | 15 a 18 | ≥ 19 |
|                       | Tetraciclina    | TET   | 30 µg         | ≤ 14                  | 15 a 18 | ≥ 19 |

\*Conc. disco = concentração do disco

R – Resistente; I – Intermediário; S – Sensível.

Quadro 2 – Interpretação dos halos de inibição para as cepas de *Vibrio* e população Gram-negativas das bactérias heterotróficas cultiváveis segundo o CLSI (2010)

| Classe                  | Antimicrobianos  | Sigla | Conc. discos* | Zona de inibição (mm) |         |      |
|-------------------------|------------------|-------|---------------|-----------------------|---------|------|
|                         |                  |       |               | R                     | I       | S    |
| <b>Aminoglicosídeos</b> | Estreptomicina   | EST   | 30 µg         | ≤ 11                  | 12 a 14 | ≥ 15 |
|                         | Gentamicina      | GEN   | 30 µg         | ≤ 12                  | 13 a 14 | ≥ 15 |
| <b>Cefalosporinas</b>   | Cefalotina       | CFL   | 30 µg         | ≤ 14                  | 15 a 17 | ≥ 18 |
|                         | Cefepima         | CPM   | 30 µg         | ≤ 14                  | 15 a 17 | ≥ 18 |
|                         | Cefotaxima       | CTX   | 30 µg         | ≤ 14                  | 15 a 22 | ≥ 23 |
|                         | Cefoxitina       | CFO   | 30 µg         | ≤ 14                  | 15 a 17 | ≥ 18 |
| <b>Fenicóis</b>         | Cloranfenicol    | CLO   | 30 µg         | ≤ 12                  | 13 a 17 | ≥ 18 |
|                         | Florfenicol      | FLF   | 30 µg         | ≤ 12                  | 13 a 17 | ≥ 18 |
| <b>Monobactâmicos</b>   | Aztreonam        | ATM   | 30 µg         | ≤ 15                  | 16 a 21 | ≥ 22 |
| <b>Nitrofuranos</b>     | Nitrofurantoína  | NIT   | 30 µg         | ≤ 14                  | 15 a 16 | ≥ 17 |
| <b>Penicilinas</b>      | Ampicilina       | AMP   | 10 µg         | ≤ 13                  | 14 a 16 | ≥ 17 |
| <b>Quinolonas</b>       | Ácido nalidíxico | NAL   | 30 µg         | ≤ 13                  | 14 a 18 | ≥ 19 |

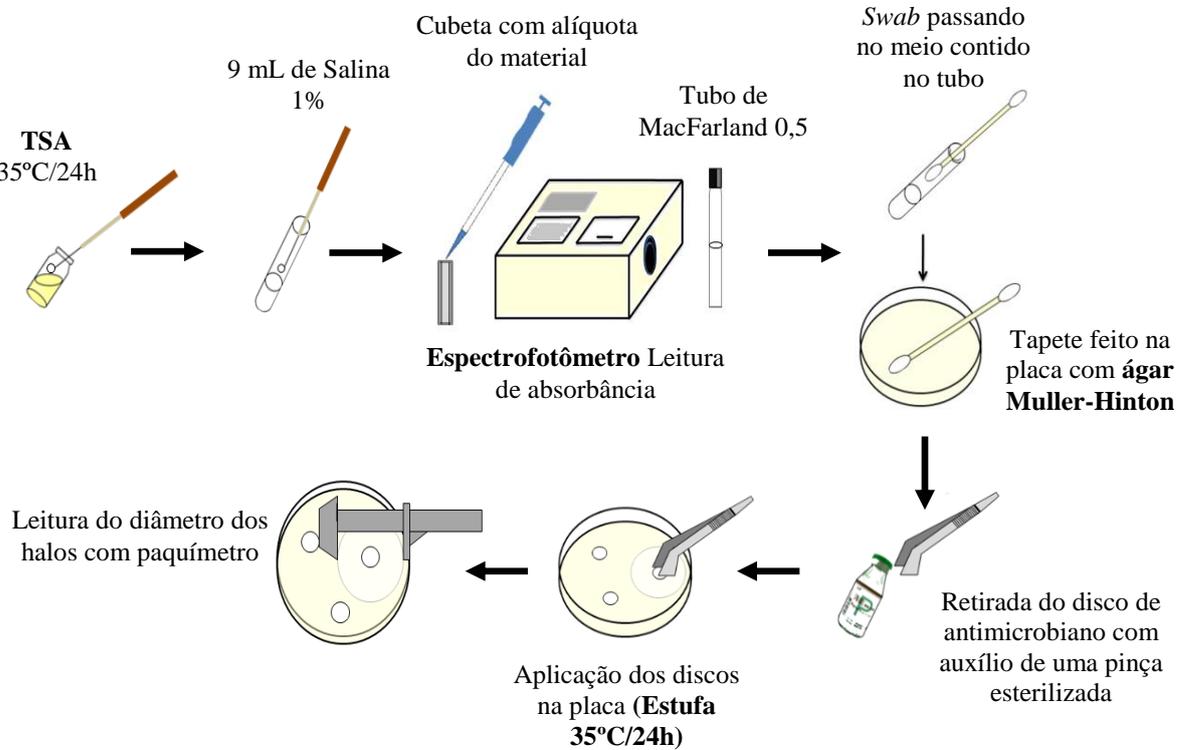
\*Conc. disco = concentração do disco

R – Resistente; I – Intermediário; S – Sensível.

Foi preparado um inóculo a partir do crescimento bacteriano em meio ágar TSA 1% e transferido com o auxílio de uma alça de níquel-cromo para salina a 1% até que se conseguisse uma suspensão compatível à turbidez padrão correspondente a 0,5 da escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Para essa compatibilidade foi utilizado um espectrofotômetro (Micronal B542), em absorvância de 625 nm. O limite de leitura aceitável variou entre 0,08 e 0,10. Em placa de Petri contendo ágar Mueller-Hinton numa espessura de 4 mm, o inóculo foi espalhado uniformemente com o auxílio de um zaragatoa estéril, de modo a cobrir homogeneamente toda a superfície da placa (FIGURA 4).

Foram utilizados discos de antimicrobianos comerciais da marca Laborclin, com exceção da oxitetraciclina, cujos discos foram confeccionados no próprio laboratório, conforme as recomendações do CLSI (2010). Os discos foram aplicados no meio, inoculado com o auxílio de uma pinça estéril, e pressionados, levemente, sobre a superfície do meio. Após a secagem, por um período máximo de 15 minutos, as placas foram incubadas invertidas, em estufa a 35 °C por 24 horas. A leitura do antibiograma foi realizada com auxílio de um paquímetro digital (Digit), a partir da medição em milímetros, do diâmetro dos halos de inibição do crescimento das colônias, frente ao antimicrobiano testado (FIGURA 4). Os resultados obtidos foram comparados com os protocolos estabelecidos por CLSI (2010). As cepas foram classificadas em sensíveis (S), intermediárias (I) ou resistentes (R) para cada antimicrobiano testado de acordo com as recomendações do fabricante (QUADRO 1 e 2).

Figura 4 – Esquema do método de difusão em disco, utilizado para determinar o perfil de susceptibilidade das cepas das populações das bactérias heterotróficas cultiváveis e de *Vibrio*, isoladas das amostras de água da área de coleta, do tecido e do líquido intervalvar das ostras cultivadas e selvagens coletadas no estuário do rio Jaguaribe, Ceará



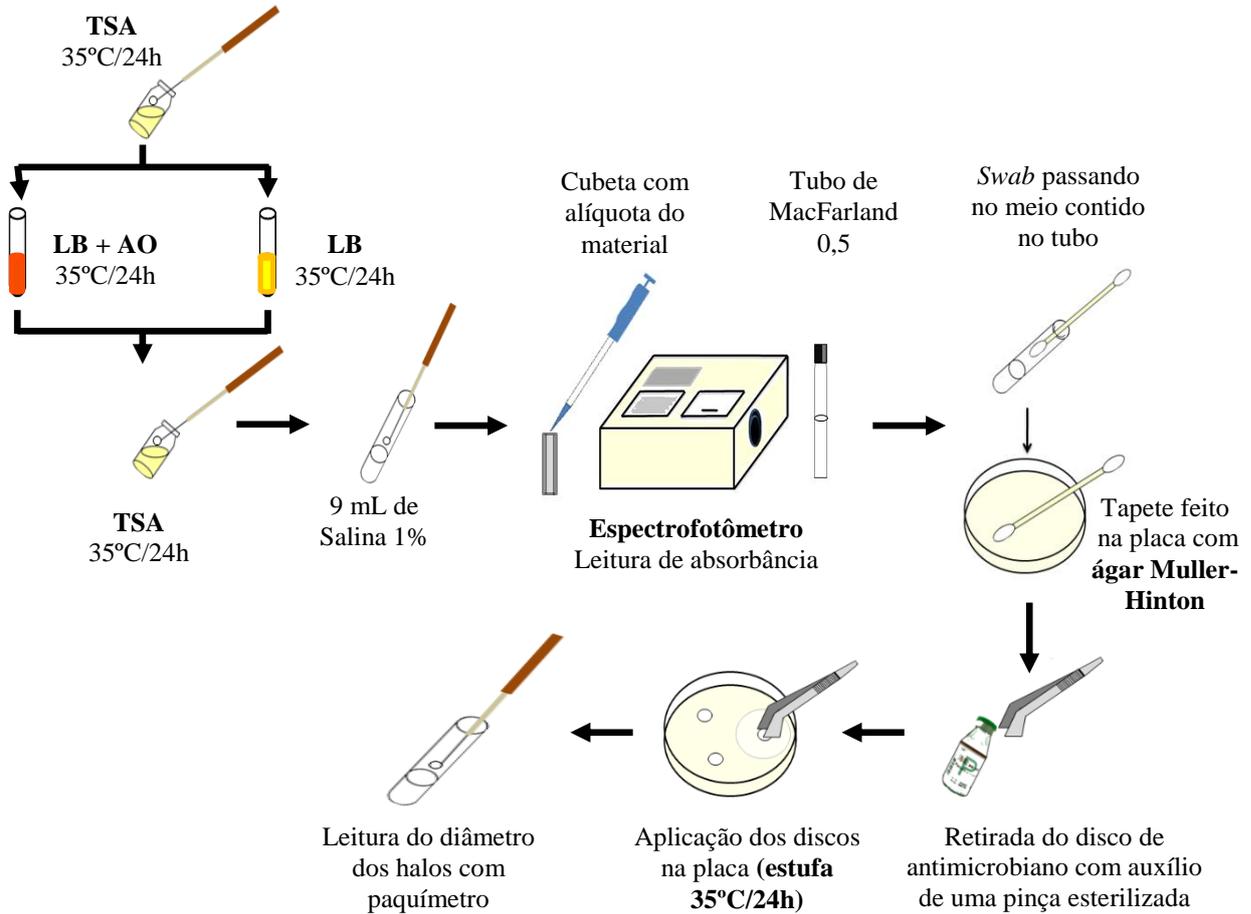
#### 4.3.2.7 Processo de cura de plasmídeo

As cepas que apresentarem perfil de multirresistência (resistência a dois ou mais antimicrobianos de diferentes classes) foram submetidas a tratamento com solução de *acridine orange* (Sigma), a fim de estabelecer a origem genética da resistência (plasmidial ou potencialmente cromossômica) de acordo com Molina-Aja *et al.* (2002).

O procedimento da *cura* plasmidial seguiu as seguintes etapas: após o crescimento bacteriano em meio ágar TSA a 1% de NaCl, uma alíquota foi inoculada com o auxílio de uma alça de níquel-cromo em meio TSB (caldo tripton de soja) a 1% de NaCl e incubados a 35 °C por 24 horas. Alíquotas das culturas renovadas foram adicionadas a tubos com o meio caldo Luria Bertani (LB) a 1% de NaCl e suplementado com 100 µg/mL de *acridine orange* (AO). O controle foi feito com inóculo das culturas em caldo LB com 1% de NaCl sem adição de *acridine orange*. Os tubos foram incubados em estufa a 35 °C por 24 horas. Após esse período as cepas foram inoculadas em TSA a 1% de NaCl e depois foram incubadas

novamente a 35 °C por 24 horas. Posteriormente estas culturas foram novamente expostas aos mesmos antimicrobianos aos quais apresentaram resistência (FIGURA 5).

Figura 5 – Esquema do procedimento de *cura* plasmidial, ao qual foram submetidas às estirpes bacterianas com perfil de multirresistência aos antimicrobianos testados



#### 4.3.2.8 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada para as cepas com perfil de multirresistência, aos antimicrobianos ampicilina (AMP) e penicilina G (PEN). Segundo as recomendações do CLSI (2010), foi utilizada a técnica de macrodiluição em caldo Mueller-Hinton (MH) acrescido de 1% de NaCl (p/v).

#### 4.3.2.8.1. Preparo das soluções estoque dos antimicrobianos

As soluções-estoque foram preparadas em concentrações dez (10) vezes superiores a maior concentração analisada, utilizando-se diluentes e solventes diferentes para cada antimicrobiano e estabelecendo-se a concentração de 1.000 µg/mL (CLSI, 2010).

##### 4.3.2.8.1.1 Penicilina G

Foram suspensos 0,416 g de penicilina G (Teuto) solubilizados e diluídos em 100 mL de água destilada. A solução foi esterilizada por filtração a vácuo em membrana de 0,22 µm de poro (Millipore).

##### 4.3.2.8.1.2 Ampicilina

Foram suspensos 0,05 g de ampicilina tri-hidratada (Sigma A6140) e solubilizados em tampão fosfato de sódio 0,01 mol/L (pH 8,0). Posteriormente foi diluído em 100 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 mol/L (pH 6,0). A solução foi esterilizada por filtração a vácuo em membrana de 0,22 µm de poro (Millipore).

#### 4.3.2.8.2 Preparo dos tubos com antimicrobianos

O tubos foram preparados com concentrações de antimicrobiano que variaram de 0 (controle) a 128 µg, sem que o volume de antimicrobiano ultrapassasse 40% do volume final no tubo (5 mL). A adição das alíquotas dos antimicrobianos, a partir dos estoques, foi realizada após esterilização dos tubos dos ensaios com caldo MH 1% de NaCl em autoclave a 121 °C por 15 minutos (CLSI, 2010).

#### 4.3.2.8.3 Preparo do inóculo

O inóculo padrão inicial foi obtido com base no procedimento descrito no item 4.3.2.6, com turbidez semelhante à solução 0,5 na escala de MacFarland. Para se obter a concentração final de bactérias do teste CIM, o inóculo inicial ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) foi diluído na proporção de 1:9 em solução salina a 1% de NaCl, correspondendo a uma concentração bacteriana de  $1,5 \times 10^7$  UFC/mL. Desta diluição foi retirada uma alíquota de 50 µL e

inoculada nos tubos, com diferentes concentrações dos antimicrobianos, bem como no tubo controle e incubados a 35 °C por 24 horas (CLSI, 2010).

#### 4.3.2.8.4 Interpretação dos resultados

Após o período de incubação, foi verificado se houve turvação ou não, nos tubos inoculados, a partir do tubo controle até aquele com maior concentração do antimicrobiano. Foi considerada a concentração inibitória mínima (CIM) da cepa analisada, a menor concentração de antimicrobiano, na qual o meio não ficou turvo.

#### 4.3.2.9 Cálculo do índice de múltipla resistência antimicrobiana (MAR)

O índice de múltipla resistência antimicrobiana (do inglês multiple antibiotic resistance) por isolado foi calculado para as cepas de BHC Gram-positivas e Gram-negativas e *Vibrio* spp., que apresentaram resistência a duas (2) ou mais classes de antimicrobianos, pela fórmula  $a/b$ , onde “a” é o número de classes de antimicrobianos aos quais a cepa se mostrou resistente e “b” o número total de classes de antimicrobianos. Caso esse índice fosse superior a 0,20 a cepa era considerada multirresistente (KRUMPERMAN, 1983).

### 4.4 Análise estatística

Foi utilizado o programa estatístico Statsoft Statistica na versão 7.0. Inicialmente, os valores dos parâmetros morfométricos tanto para as ostras cultivadas quanto selvagens, foram submetidos à análise de correlação com as variáveis físico-químicas (temperatura, salinidade e pH da água). O mesmo foi feito entre os valores das unidades formadoras de colônias das ostras cultivadas e das ostras nativas com as variáveis físico-químicas (temperatura, salinidade e os pH da água, tecido e líquido intervalvar).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Parâmetros físico-químicos da água nas áreas de coleta

Na tabela 1 estão apresentados os dados referentes aos parâmetros físico-químicos registrados nas águas de entorno das áreas de coleta de ostras cultivadas (OC) e ostras selvagens (OS) em dois (2) períodos: com chuvas escassas (estio) e chuvoso.

Tabela 1 – Média e desvio padrão dos parâmetros físico-químicos das amostras de água nos pontos de coleta de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) durante os períodos de estio e chuvoso, no estuário do rio Jaguaribe (Pontal do Maceió, Fortim – Ceará)

| Período | Fonte           | Fatores físico-químicos |              |             |
|---------|-----------------|-------------------------|--------------|-------------|
|         |                 | Temperatura (°C)        | Salinidade   | pH          |
| Estio   | Área de cultivo | 29,74 ± 1,44            | 40,39 ± 0,88 | 8,24 ± 0,04 |
|         | Banco natural   | 29,92 ± 1,60            | 39,98 ± 0,80 | 8,25 ± 0,03 |
| Chuvoso | Área de cultivo | 28,68 ± 1,04            | 36,56 ± 1,52 | 8,28 ± 0,07 |
|         | Banco natural   | 28,47 ± 1,20            | 36,37 ± 1,28 | 8,29 ± 0,06 |

As temperaturas da água do entorno nos locais de coleta das ostras durante a estiagem variaram de 28 a 33 °C e de 28 a 34 °C, no banco e área onde se concentravam os cultivos, respectivamente. No período chuvoso foram verificadas menores variações na temperatura (27 a 30 °C) para ambos os pontos. A pouca variação na temperatura das águas é uma característica do ambiente litorâneo cearense. Apesar de prevalecer o clima semi-árido no Estado do Ceará, o litoral é regido por uma condição climática descrita como tropical chuvosa (SOUSA, 2006). As temperaturas registradas são consideradas ideais para a proliferação de micro-organismos mesófilos, grupo do qual fazem parte os gêneros *Aeromonas* e *Vibrio*, além de outras bactérias heterotróficas (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

Nas amostras de água do período de estio, foi observada uma variação na salinidade de 39 a 42 e de 38 a 42, para as OC e OS, respectivamente, e no período chuvoso os valores variaram de 35 a 39, para as duas regiões.

As salinidades ficaram em torno de 40 nas duas áreas no período de estio, e 36 na estação chuvosa. De acordo com alguns pesquisadores (COSTA *et al.*, 2010; MCKINNON *et al.*, 2010; ODU *et al.*, 2011; SILVEIRA *et al.*, 2011; SOUSA *et al.*, 2006; VIEIRA; VASCONCELOS; CARVALHO, 2007), as precipitações pluviométricas que ocorrem na

estação chuvosa contribuem para reduzir a salinidade, ocasionando uma diferença da salinidade entre os dois períodos estudados. As salinidades encontradas na estrutura de cultivo e no banco natural da *Crassostrea rhizophorae*, são muito superiores àquelas recomendadas pelo manual de cultura de bivalves da FAO Fisheries, que determina como adequada, uma salinidade entre 20 e 25, para a malacocultura da espécie citada (HELM; BOURNE; LOVATELLI, 2004).

Guimarães, Momesso e Pupo (2008) afirmam que as salinidades abaixo de 10 e superiores a 30 causam estresse e inviabilizam o cultivo da *C. rhizophorae*, ocorrendo um índice elevado de mortalidade.

Alguns autores (ALVARENGA; NALESSO, 2006; BRITO, 2008; VILANOVA; FONTELES-FILHO, 1989) ratificam que salinidade acima de 30 pode interferir no crescimento da *Crassostreas* spp., visto que segundo Fernández-Reiriz, Navarro, Labarta (2005) e Zhuang (2006a) salinidade interfere diretamente na taxa de ingestão e eficiência de assimilação dos animais (FERNÁNDEZ-REIRIZ; NAVARRO; LABARTA, 2005; ZHUANG, 2006). Em nossa pesquisa, foi observada frequentemente a presença de conchas vazias tanto da estrutura de cultivo como do banco natural, porém a causa da mortalidade das ostras não pode ser associada somente a salinidade, uma vez que era constatado também a predação por moluscos gastrópodes nos dois locais.

O pH na água do entorno das áreas de coleta apresentou pouca variação ficando em torno de 8,0 para ambos os períodos ao contrario do que foi observado por Vieira, Vasconcelos e Carvalho (2007) no mesmo local. Contudo, Sousa *et al.* (2006) também relataram pouca variação dos valores de pH da água, no estuário do rio Jaguaribe e em mais três (3) estuários (rio Pacoti, rio Choró e rio Pirangi) no Estado do Ceará. A ocorrência ou não de precipitação pluviométrica durante os períodos de coleta nessas pesquisas poderiam explicar as diferentes situações registradas.

De acordo com Pereira *et al.* (2001), o pH da água abaixo de 6,72 reduz a taxa de filtração da ostra, com redução na captação de alimento. Como na presente pesquisa o pH esteve acima de 8,0, seu valor não deve ter inviabilizado o processo de alimentação dos animais.

## 5.2 Morfometria e parâmetros físico-químicos das ostras

As características morfométricas das ostras e variáveis físico-químicas dos tecidos moles e líquido intervalvar dos animais foram registrados na tabela 2. Para acompanhar o crescimento dos espécimes ao longo do período de coleta foi estabelecida a biometria das conchas entre os animais coletados. A média dos tamanhos das conchas, por coleta, das OC e OS variou de 42,38 a 60,66 mm e de 36,15 a 48,63 mm, respectivamente. A média geral de todas as amostras foi de 48,35 mm para as OC e de 38,73 mm para OS.

O peso médio dos tecidos moles (TM) entre os animais dos dois locais variou de 1,70 a 3,30 mg (OC) e de 1,24 a 2,12 (OS), com médias gerais de 2,51 mg e 1,53 mg, respectivamente.

O volume médio, por coleta, do líquido intervalvar (LI) das OC e OS variou de 1,41 a 3,26 mL e de 0,65 a 1,97 mL, com médias gerais de 2,24 mL e 1,23 mL, respectivamente.

O pH das amostras de TM das OC e OS variou de 6,23 a 6,37 e de 6,23 a 6,64, durante a estiagem, respectivamente, e no período chuvoso de 6,11 a 6,26 e de 6,16 a 6,28 para as OC e OS, respectivamente. Já os valores de pH registrados no LI das OC e OS variaram de 6,88 a 7,16 e de 6,85 a 7,15 durante a estiagem, respectivamente, e no período chuvoso de 6,76 a 7,02 e de 6,83 a 7,08 para as OC e OS, respectivamente. Dentre os parâmetros físico-químicos (temperatura, salinidade e pH) avaliados na água, nenhum deles apresentou correlação com as características morfométricas (tamanho das conchas, peso do tecido mole e volume do líquido intervalvar) dos espécimes de *C. rhizophorae* cultivados ou selvagens, durante todo o período estudado.

Tabela 2 – Média e desvio padrão das medidas morfométricas e físico-químicas dos espécimes de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) selvagens e cultivadas, coletadas na área do rio Jaguaribe (Pontal do Maceió em Fortim – Ceará)

| Período | Fonte           | N. de amostra* | Fatores físico-químicos |             |             |              |             |
|---------|-----------------|----------------|-------------------------|-------------|-------------|--------------|-------------|
|         |                 |                | Tamanho (mm)*           | Tecido      |             | Líquido      |             |
|         |                 |                |                         | Peso (g)*   | pH*         | Volume (mL)* | pH*         |
| Estio   | Área de cultivo | 10 ± 0         | 57,21 ± 7,45            | 2,35 ± 0,34 | 6,31 ± 0,05 | 2,40 ± 0,53  | 7,05 ± 0,08 |
|         | Banco natural   | 11,25 ± 1,68   | 39,60 ± 3,88            | 1,66 ± 0,28 | 6,40 ± 0,10 | 1,52 ± 0,53  | 7,00 ± 0,08 |
| Chuvoso | Área de cultivo | 15 ± 0         | 47,14 ± 4,50            | 2,58 ± 0,38 | 6,17 ± 0,04 | 1,93 ± 0,37  | 6,94 ± 0,09 |
|         | Banco natural   | 18,06 ± 2,16   | 38,19 ± 3,70            | 1,38 ± 0,08 | 6,22 ± 0,03 | 0,86 ± 0,27  | 7,00 ± 0,07 |

\*: Média geométrica;

Núñez *et al.* (2010) no entanto, comprovaram que a temperatura e a biomassa fitoplanctônica foram as principais variáveis ambientais que influenciaram o crescimento de *C. rhizophorae* cultivadas em regiões subtidal e intertidal, no Golfo de Cariaco, Venezuela.

Ostras do gênero *Crassostrea* são extremamente tolerantes à temperatura e salinidade no ambiente de cultivo. Em experimento, feito entre o crescimento das ostras (*C. gigas*, *C. rhizophorae* e *C. virginica*) e variação desses dois fatores, Helm, Bourne e Lovatelli (2004) concluíram que a temperatura ideal é de 28 °C e a salinidade de 25. No presente estudo, portanto, as médias dos dois parâmetros ambientais estiveram acima do considerado ideal pela literatura.

### 5.3 Quantificação de bactérias heterotróficas cultiváveis

A característica de alimentação dos moluscos faz com que esses animais acumulem no seu trato intestinal, concentrações elevadas de células bacterianas e outras moléculas presentes nas águas de entorno. Isso fez com que esses organismos sejam utilizados em programas de monitoramento, como bioindicadores da qualidade do ambiente aquático (FARRAPEIRA *et al.*, 2010; MINGUEZ *et al.*, 2011).

As densidades das populações de bactérias heterotróficas encontrados nas amostras de água e em diferentes estruturas das ostras coletadas estão apresentadas na tabela 3. A contagem de BHC em amostras de água, TM e LI das OC variou de 490 a  $40 \times 10^5$  UFC/mL,  $48 \times 10^2$  a  $11 \times 10^6$  UFC/g, <100 a  $16 \times 10^6$  UFC/mL estimado (est.), respectivamente, e nas OS de 340 a  $18 \times 10^6$  UFC/mL,  $32 \times 10^2$  a  $44 \times 10^4$  UFC/g,  $13 \times 10^2$  a  $54 \times 10^4$  UFC/mL, respectivamente.

Na Nigéria, Eduok *et al.* (2010) detectaram contagens de BHC, em amostras de água e ostras (*Crassostrea tulipa*), variando de  $8,8 \times 10^4$  a  $10,8 \times 10^4$  UFC/mL e de  $12,5 \times 10^6$  a  $17,9 \times 10^6$  UFC/g, respectivamente. Resultados menores foram encontrados por Pujalte *et al.* (1999), com contagens de BHC variando de  $32 \times 10^3$  a  $37 \times 10^5$  UFC/g e de 87 a  $54 \times 10^2$  UFC/g em amostras de ostra (*Ostrea edulis*) e de água do mar, respectivamente, na costa de Vinaroz, na Espanha.

Tabela 3 – Contagens de bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC) nas amostras de água, líquido intervalvar e tecido de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) cultivadas e selvagens, coletadas no período de estio e chuvoso no Pontal do Maceió em Fortim – Ceará

| Período | Coletas         | Unidades formadoras de colônias (UFC) de BHC |                        |                          |                        |                        |                          |
|---------|-----------------|--|------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|
|         |                 | Cultivadas                                   |                        |                          | Selvagens              |                        |                          |
|         |                 | Água   | Tecido                 | Líquido                  | Água                   | Tecido                 | Líquido                  |
| Estio   | 1 <sup>a</sup>  | 40 x 10 <sup>5</sup>                         | 56 x 10 <sup>3</sup>   | 61 x 10 <sup>3</sup>     | 560                    | 19,1 x 10 <sup>3</sup> | 61 x 10 <sup>2</sup>     |
|         | 2 <sup>a</sup>  | 16,5 x 10 <sup>3</sup>                       | 45 x 10 <sup>4</sup>   | 78,5 x 10 <sup>3</sup>   | 94,5 x 10 <sup>3</sup> | 44 x 10 <sup>4</sup>   | 37,5 x 10 <sup>3</sup>   |
|         | 3 <sup>a</sup>  | 51 x 10 <sup>3</sup>                         | 16,9 x 10 <sup>4</sup> | 10 x 10 <sup>4</sup>     | 12,2 x 10 <sup>3</sup> | 15,1 x 10 <sup>4</sup> | 33,5 x 10 <sup>3</sup>   |
|         | 4 <sup>a</sup>  | 11,7 x 10 <sup>5</sup>                       | 11 x 10 <sup>6</sup>   | 17,6 x 10 <sup>5</sup>   | 17,9 x 10 <sup>6</sup> | 95 x 10 <sup>3</sup>   | 54,5 x 10 <sup>4</sup>   |
|         | 5 <sup>a</sup>  | 35,5 x 10 <sup>2</sup>                       | 12,6 x 10 <sup>4</sup> | 22,4 x 10 <sup>3</sup>   | 37,5 x 10 <sup>2</sup> | 61 x 10 <sup>3</sup>   | 17,6 x 10 <sup>3</sup>   |
|         | MG              | 10,7 x 10 <sup>4</sup>                       | 35,8 x 10 <sup>4</sup> | 11,4 x 10 <sup>4</sup>   | 33,7 x 10 <sup>3</sup> | 94 x 10 <sup>3</sup>   | 37,4 x 10 <sup>3</sup>   |
| Chuvoso | 6 <sup>a</sup>  | 34,5 x 10 <sup>2</sup>                       | 88,5 x 10 <sup>4</sup> | <100*                    | 33 x 10 <sup>2</sup>   | 18,4 x 10 <sup>4</sup> | 33 x 10 <sup>3</sup>     |
|         | 7 <sup>a</sup>  | 88 x 10 <sup>2</sup>                         | 10,3 x 10 <sup>4</sup> | 16,2 x 10 <sup>4</sup>   | 10,5 x 10 <sup>3</sup> | 20,4 x 10 <sup>3</sup> | 18,2 x 10 <sup>3</sup>   |
|         | 8 <sup>a</sup>  | 490  | 48 x 10 <sup>2</sup>   | 15,7 x 10 <sup>2</sup>   | 345                    | 32 x 10 <sup>2</sup>   | 13,3 x 10 <sup>2</sup>   |
|         | 9 <sup>a</sup>  | 62 x 10 <sup>2</sup>                         | 35,5 x 10 <sup>4</sup> | 47,5 x 10 <sup>3</sup>   | 51,5 x 10 <sup>2</sup> | 13,5 x 10 <sup>4</sup> | 35 x 10 <sup>3</sup>     |
|         | 10 <sup>a</sup> | 87 x 10 <sup>4</sup>                         | 10,6 x 10 <sup>6</sup> | 15,6 x 10 <sup>6</sup> * | 78 x 10 <sup>4</sup>   | 41 x 10 <sup>3</sup>   | 40,7 x 10 <sup>4</sup> * |
|         | MG              | 95,7 x 10 <sup>2</sup>                       | 27,8 x 10 <sup>4</sup> | 28,5 x 10 <sup>3</sup>   | 86,3 x 10 <sup>2</sup> | 36,7 x 10 <sup>3</sup> | 25,7 x 10 <sup>3</sup>   |

\*: estimativa; MG: média geométrica.

As médias geométricas de BHC nas amostras da água, TM e LI de ostras cultivadas foram de  $10,7 \times 10^4$  UFC/mL,  $35,8 \times 10^4$  UFC/g,  $11,4 \times 10^4$  UFC/mL no período de estio, e de  $95,7 \times 10^2$  UFC/mL,  $27,8 \times 10^4$  UFC/g,  $28,5 \times 10^3$  UFC/mL, no período chuvoso, respectivamente. Nas amostras de água, TM e LI das OS obtiveram valores médios de  $33,7 \times 10^3$  UFC/mL,  $94 \times 10^3$  UFC/g,  $37,4 \times 10^3$  UFC/mL no período de estio, e de  $86,3 \times 10^2$  UFC/mL,  $36,7 \times 10^3$  UFC/g,  $25,7 \times 10^3$  UFC/mL, no período chuvoso, respectivamente. Paillard, Ashton-Alcox e Ford (1996) relataram quantificações médias de  $1,7 \times 10^6$  UFC/g e de  $4,7 \times 10^5$  UFC/mL, nos TE e LI de ostras (*C. virginica*) sadias extraídas de Long Island, nos Estados Unidos, respectivamente. Esses resultados foram superiores aos observados no presente trabalho.

Durante a estiagem foram as amostras de água e de TM e LI das OC que tiveram maiores médias de quantificações de BHC, e no período chuvoso foram as amostras de TM das OC que tiveram maior média da população de BHC. Contudo, o maior índice médio da população das BHC durante todo o período de análise, foram concentrados nas amostras de tecidos moles das OC ( $31,5 \times 10^4$  UFC/g).

As médias geométricas das quantificações de BHC das amostras de água, TM e LI como um todo foram de  $60 \times 10^3$  UFC/mL,  $18,3 \times 10^4$  UFC/g,  $65,2 \times 10^3$  UFC/mL no período de estio e de  $90,9 \times 10^2$  UFC/mL,  $10,1 \times 10^4$  UFC/g,  $27,1 \times 10^3$  UFC/mL, no período chuvoso. Durante a estiagem foi notável a elevação no número das populações de BHC, entre as amostras TM sobre as de água e LI. Consequentemente, calculando-se a média geométrica de todas as amostras, as de TM tiveram a maior população de BHC ( $13,6 \times 10^4$  UFC/g).

A incidência de chuvas foi uma variável determinante sobre a densidade populacional de bactérias na água. As maiores contagens de BHC nas amostras de água foram observadas no período de estiagem, sugerindo um efeito diluidor das chuvas sobre a microbiota de corpos aquáticos. Esse efeito já foi verificado em trabalhos anteriores em estuários da costa cearense (SOUSA, 2006; VIEIRA; VASCONCELOS; CARVALHO, 2007). O mesmo efeito não foi evidenciado sobre a microbiota do tecido e líquido interlar das ostras. Mesmo com a redução da carga microbiana na água circundante, a densidade de bactérias no interior das ostras continuou elevada.

Contudo, alguns autores (CAVALLO; ACQUAVIVA; STABILI, 2009; KOLM; ABSHER, 1995; STABILI; CAVALLO, 2004), observaram correlações positivas entre as bactérias heterotróficas cultiváveis, temperatura e pluviosidade durante o período mais quente do ano, comprovando que o aumento das bactérias no verão (estação chuvosa) foi influenciado não só pelo aumento da pluviosidade, mas também pela elevação da temperatura.

Em um estudo semelhante, foi possível se determinar a influência sazonal nas contagens de BHC em bivalves, assim, os autores concluíram, que durante a estiagem a população de BHC foi significativamente maior nos TM do que no período chuvoso (ADJEI-BOATENG; AMISAH; QUAGRAINIE, 2009).

Corroborando com a pesquisa, Eduok *et al.* (2010), Pujalte *et al.* (1999), Vieira, Vasconcelos e Carvalho (2007) confirmam uma maior abundância das BHC nos TM das ostras, do que na água circundante. Segundo Valley *et al.* (2009), as ostras funcionam como microambientes que permitem a proliferação da maioria das espécies bacterianas que se especializam nesses ambientes, podendo coabitar com espécies transientes ingeridas durante o processo respiratório e mecanismos de alimentação.

Cavallo, Acquaviva e Stabili (2009) realizaram uma pesquisa similar sobre a quantificação de BHC em *Mytilus galloprovincialis* e da água circundante, em três (3) pontos (S. Vito, Lido Gandoli e Lido Silvana), no norte do Mar Jônico, na Itália, e puderam concluir também, que o número de BHC presente nos bivalves foi superior ao da água circundante. Na Tunísia, Mechri *et al.* (2011), também confirmaram a superioridade do número de BHC em bivalves (*Ruditapes decussatus*) sobre amostras de água do entorno, coletadas no Golfo de Gabes.

Segundo Pavlov *et al.* (2004) a maioria das BHC são inofensivas a grande parte da população, porém uma parcela da humanidade composta por indivíduos imunocomprometidos podem estar em risco. Os autores apontam resultados perigosos, obtidos em estudo com 339 (trezentas e trinta e nove) cepas isoladas de corpos de água potável tratada e não tratada, na África do Sul, das quais, 55,5% (188) dos isolados apresentaram alfa ou beta hemólise em ágar sangue humano e de cavalo. A partir das cepas hemolíticas (188) foram também realizados e confirmados outros testes potenciais de patogenicidade, com condroitinase (5,3%), coagulase-positiva (16%), DNase (60,6%), elastase (33%), fibrinolisinase (53,7%), gelatinase (62,2%), hialuronidase (21,3%), lecitinase (47,9%), lipase (54,8%) e proteinase (64,4%).

Gall, Hassen e Gall (1997) descrevem as bactérias heterotróficas como uma das bases do nível trófico, no fluxo de carbono e nitrogênio em animais filtradores. Segundo os autores, o bacterioplâncton é responsável por 56% da biomassa do carbono orgânico assimilado pelas ostras, porém as bactérias possuem um tamanho diminuto, e não são retidas no processo de alimentação, sem a interferência de ciliados (protozoários) como intermediários no fluxo de energias, das bactérias heterotróficas para as ostras.

A legislação brasileira não estabelece níveis de BHC nos tecidos moles de ostras destinadas ao consumo, por isso foi feita uma comparação com os parâmetros preconizados pela agência americana Food and Drug Administration (FDA). De acordo com a legislação americana, os níveis de bactérias devem ser inferiores a  $5 \times 10^5$  UFC/g (CFSAN, 2003). Analisando as contagens bacterianas nos tecidos moles das ostras foi possível verificar que 30% (3) das amostras estavam acima dos padrões estabelecidos como aceitável entre os espécimes cultivados, enquanto que nas ostras nativas 100% (10) das amostras se mostraram adequadas para consumo. A diferença nos níveis de contaminação bacteriana nas duas populações de ostras, pode ser resultado da proximidade dos cultivos da área urbana da cidade de Fortim sofrendo influência de esgotos domésticos.

Adjei-Boateng, Amisah, Quagrainie (2009), Eduok *et al.* (2010) e Hatha *et al.* (2005), em estudos sobre a quantificação de BHC em bivalves, descreveram resultados muito superiores aos deste estudo, os autores constataram um percentual de reprovação igual ou superior a 95% das amostras de tecido dos bivalves. Os autores relacionaram esses valores elevados de BHC nos animais a contaminação dos estuários por descarte inadequado de esgoto bruto e/ou parcialmente tratado como também de resíduos industriais.

Diante do número elevado de BHC, principalmente nas ostras retiradas do cultivo, sugere-se que, seguindo recomendação feita por Eduok *et al.* (2010) e Hatha *et al.* (2005), seja feita a depuração dos moluscos bivalves em água corrente limpa e/ou cocção, para reduzir a carga bacteriana a níveis aceitáveis.

Dentre os parâmetros ambientais estudados, apenas a salinidade foi correlacionada ( $r > 0,9$  e  $P = 0,02$ ) com as contagens das BHC presentes nos LI das OC coletados durante a estação chuvosa. Entretanto, diferentemente dos resultados descritos, Valle *et al.* (2009) relatam a influência da temperatura sobre abundância das BHC em amostra de ostra e água. Cavallo, Acquaviva e Stabili (2009), também comprovaram uma correlação positiva entre a quantificação de BHC e a temperatura da água circundante, em amostras de bivalves e água.

Outros trabalhos, como os de Stabili e Cavallo (2011) mencionaram a influência da temperatura sobre a contagem das BHC, em águas costeiras de San Cataldo e Otranto (Itália). No entanto, a sazonalidade não foi evidenciada em outros dois pontos (Santa Maria di Leuca e Brindisi), principalmente devido à presença de duas fontes pontuais de nutrientes (resíduos industriais e urbanos) que os supriam durante o inverno e verão, assim sustentando o crescimento bacteriano ao longo do ano.

No México, Gonzalez-Acosta *et al.* (2006) pesquisando BHC em sedimentos de manguezais, detectaram correlação negativa entre a temperatura da água com abundância das

BHC. Segundo os mesmos autores, este fato possivelmente esteve relacionado à redução do oxigênio na água e ao aumento da temperatura, que favoreceram a elevada proliferação de algas e microalgas, devido à eutrofização, fazendo com que as bactérias migrassem para a coluna d'água.

Segundo Paillard, Roux e Borrego (2004) a microbiota de organismos aquáticos é muito rica, e muitos desses micro-organismos se comportam como patógenos oportunistas, necessitando apenas de uma variação das condições ambientais, para gerar um quadro infeccioso. Os autores consideram a temperatura, como um dos principais fatores ambientais, no desencadeamento de doenças bacterianas em bivalves.

Justificando os dados, Evans *et al.* (2011) determinaram a salinidade e o nitrogênio (nitrito, nitrato, e as concentrações de amônia), como os principais parâmetros ambientais moduladores da comunidade microbiana, sendo responsáveis por 72% das variações da estrutura populacional. Conforme Silveira *et al.* (2011), a salinidade é o principal parâmetro abiótico em ambientes aquáticos, que determina composição e abundância da população microbiana heterotrófica.

Segundo alguns autores (BÅÅTH, 2010; CARPENTER; BROADBENT, 2009; FRANCO; LANDGRAF, 1996; MADIGAN *et al.* 2010a; ROUSK *et al.*, 2010; RUSSELL; DOMBROWSKI, 1980) os micro-organismos possuem valores de pH mínimo, ótimo e máximo para sua multiplicação, e a maioria das bactérias apresentam melhor desenvolvimento em ambientes com pH por volta da neutralidade (6,5 a 7,5), porém as bactérias têm preferência por *habitats* alcalinos, podendo apresentar crescimento em pH variando de 4,5 a 9.

De acordo com Lindström, Agterveld e Zwart (2006) o pH é a variável ambiental mais fortemente correlacionada com os padrões de distribuição dos grupos bacterianos. Os autores relatam para ecossistemas aquáticos as diferentes classes de bactérias que habitam estes locais, podendo apresentar correlações proporcionais ou inversamente proporcionais ao pH, dependendo apenas da afinidade destas por meios mais alcalinos ou ácidos. Por esta razão, muitas vezes as populações bacterianas não apresentam uma correlação clara com o pH, quando analisadas como um todo.

A pouca oscilação dos parâmetros ambientais (temperatura, salinidade e pH) na água, analisada na presente pesquisa, durante as estações estudadas, explica a inexistência de correlação com as contagens das BHC. Resultados similares foram relatados por Stabili e Cavallo (2011), analisando uma área na costa italiana no mar Adriático.

#### 5.4 Quantificação de *Vibrio* spp.

Os víbrios, que fazem parte das BHC (STALEY *et al.*, 2005), foram quantificados separadamente. O gênero *Vibrio* é composto por espécies que tem importância para a saúde humana e a dos animais aquáticos marinhos cultivados, além de desempenharem um importante papel ecológico no ambiente estuarino (IGBINOSA; OBI; OKOH, 2009; THOMPSON; LIDA; SWINGS, 2004).

As densidades das populações de víbrios encontrados nas amostras de água e em diferentes estruturas internas das ostras coletadas estão apresentadas na tabela 4.

As médias geométricas das quantificações de *Vibrio* spp. das amostras de água, TM e LI foram de 41,9 UFC/mL, 339 UFC/g, 50,8 UFC/mL, no período de estio, e 26,3 UFC/mL, 282 UFC/g, 63,1 UFC/mL, no período chuvoso, respectivamente. Os resultados médios obtidos destas quantificações demonstraram uma população maior no TM (309 UFC/g), do que nas amostras d'água (33,2 UFC/mL) e LI das ostras (56,6 UFC/mL).

Verificando as contagens por tipo de amostra, percebem-se maiores valores na amostra de tecido das OC (275 UFC/g) e OS (418 UFC/g), durante o período de estio, e maiores contagens nos tecidos das OC (595 UFC/g) e OS (133 UFC/g), e no LI das OC (191 UFC/g), no período chuvoso. Contudo, não houve diferença significativa entre as estações por amostras equivalentes, assim, as contagens não sofreram influências sazonais. Vieira, Vasconcelos e Carvalho (2007) estudando o mesmo estuário, também verificaram um número maior de *Vibrio* spp. nas ostras (*C. rhizophorae*) do que na água. Outras pesquisas também relacionaram maiores densidades populacionais de víbrios nos tecidos de moluscos bivalves comparados com a água de entorno (EDUOK *et al.*, 2010, MECHRI *et al.*, 2011). Esse fato já era esperado, uma vez que esses moluscos bivalves se alimentam filtrando a água e acumulando em seus tecidos partículas presentes, inclusive bactérias.

De acordo com Saulnier *et al.* (2010), a carga bacteriana presente nos TM das ostras pode oscilar conforme a origem do animais e a época do ano, com uma tendência crescente quando a temperatura da água for superior a 19 °C.

Tabela 4 – Contagens de *Vibrio* spp. nas amostras de água, líquido intervalvar e tecido de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) cultivadas e selvagens, coletadas no período de estio e chuvoso no Pontal do Maceió em Fortim – Ceará

| Período | Coletas         | Unidades formadoras de colônias (UFC) de <i>Vibrio</i> spp. |                          |         |           |                        |         |
|---------|-----------------|---|--------------------------|---------|-----------|------------------------|---------|
|         |                 | Cultivadas  |                          |         | Selvagens |                        |         |
|         |                 | Água  | Tecido                   | Líquido | Água      | Tecido                 | Líquido |
| Estio   | 1 <sup>a</sup>  | 150*  | 14,5 x 10 <sup>2</sup>   | 375*    | 700*      | 21,8 x 10 <sup>2</sup> | 325*    |
|         | 2 <sup>a</sup>  | <20*  | 625 <sup>1</sup> *       | 75*     | 50*       | 290                    | 25*     |
|         | 3 <sup>a</sup>  | <20*  | 25*                      | 125*    | <20*      | 325*                   | 25*     |
|         | 4 <sup>a</sup>  | 50*   | 400*                     | <20*    | <20*      | 50*                    | <20*    |
|         | 5 <sup>a</sup>  | <20*  | 175*                     | <20*    | <20*      | 125*                   | <20*    |
|         | MG              | 35,5  | 275                      | 67,5    | 48,9      | 418                    | 38,2    |
| Chuvoso | 6 <sup>a</sup>  | <20*  | 175*                     | 175*    | 25*       | 25*                    | <20*    |
|         | 7 <sup>a</sup>  | <20*  | 975*                     | 150*    | <20*      | 100*                   | <20*    |
|         | 8 <sup>a</sup>  | 25*   | 11,8 x 10 <sup>2</sup> * | 425*    | <20*      | 300*                   | <20*    |
|         | 9 <sup>a</sup>  | 125*  | 16 x 10 <sup>2</sup>     | 75*     | 25*       | 750*                   | 25*     |
|         | 10 <sup>a</sup> | 25*   | 225*                     | 300*    | <20*      | 75*                    | <20*    |
|         | MG              | 31,5  | 595                      | 191     | 21,9      | 133                    | 20,9    |

\*: estimativa; MG: média geométrica.

Em Vieira *et al.* (2010b), a quantificação de *Vibrio* spp. em *C. rhizophorae* cultivadas no estuário do rio Pacoti, no Estado do Ceará, foi muito superior às mencionadas neste trabalho, variando de 25 a 59 x 10<sup>6</sup> UFC/g, e com uma média de 23,8 x 10<sup>4</sup> UFC/g por amostra de TM e LI. Isso pode estar relacionado ao grande aporte de matéria orgânica lançada nesse rio proveniente de áreas metropolitanas de municípios que não cotam com tratamento de esgotos.

A contagem elevada de *Vibrio* spp. em ostras pode viabilizar a presença de espécies patogênicas ao homem, como *V. parahaemolyticus*, *V. carchariae*, *V. alginolyticus* e *V. vulnificus*. Em uma pesquisa, na qual foi analisada a microbiota dos tecidos e LI de *C. rhizophorae in natura*, servida em restaurantes do Rio de Janeiro, mais de 60% dos isolados foram identificados como pertencentes às espécies patogênicas citadas (PEREIRA; VIANA; RODRIGUES, 2007).

Segundo a FDA (2009), os víbrios marinhos são responsáveis, nos Estados Unidos, por uma parcela do quadro de doenças e mortes relacionadas aos alimentos. Como micro-organismos autóctones de ambientes costeiros, essas bactérias não apresentam correlação com a poluição destes, portanto, o controle ambiental não resultará na diminuição desse risco. É consenso entre as autoridades de saúde, que pessoas clinicamente comprometidas devem evitar o consumo de moluscos crus, devido ao risco de exposição a um grande número de bactérias potencialmente patogênicas.

Rodrigues *et al.* (2001) estudaram a incidência de vibriões em feridas cutâneas, com processo infeccioso, em pescadores do município de Raposa, Estado do Maranhão, e constataram que 42% (21) dos indivíduos eram portadores de *Vibrio* spp. As espécies mais frequentemente isoladas foram: *V. alginolyticus* (66,6%), *V. parahaemolyticus* (42,8%) e *V. cholerae* não O1 (9,5%).

Espécies do gênero *Vibrio* também podem atuar como importantes patógenos de moluscos. Na França, Irlanda e Reino Unido espécies de *Vibrio* foram relacionadas como principais responsáveis pela mortalidade em populações de ostras do Pacífico (*C. gigas*) durante o verão (EFESA, 2010).

Os parâmetros ambientais da água (temperatura, salinidade e pH) e as contagens de *Vibrio* spp. registradas, não apresentaram correlação. A salinidade foi o parâmetro ambiental, que apresentou maior variação entre os dois períodos estudados, no entanto, foi constatada a ausência de influência desta sobre as contagens de *Vibrio* spp. A ausência de correlação entre a quantificação de *Vibrio* spp. e a salinidade da água, também foi verificada por Costa *et al.* (2010), no estuário do rio Coreau (Ceará, Brasil). Reyes-Velázquez *et al.*,

(2010) observaram a ausência de correlação entre contagens da espécie *V. alginolyticus* das amostras de água de um sistema lagunar, na costa do Golfo do México com a salinidade ou temperatura. Na Holanda, essa falta de correlação entre o número de *Vibrio* spp. e a temperatura da água foi mencionada por Schets *et al.* (2011).

Em contrapartida, Igbinosa, Okoh (2008), Igbinosa, Obi e Okoh (2011) ressaltam que a temperatura, salinidade e pH da água são os principais fatores que influenciam na distribuição de *Vibrio* spp. em ambientes aquáticos, associados a organismos ou como células livres, em regiões de clima temperado. Pereira *et al.* (2011) relataram uma sazonalidade das principais espécies de *Vibrio* patogênicas para o homem (*V. anguillarum*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus* e *V. parahaemolyticus*), com um aumento na abundância do gênero relacionada ao aumento da temperatura, em regiões de clima tropical.

O pH (água, TM e LI das ostras) foi o parâmetro ambiental, que apresentou menor oscilação durante o período estudado, com desvio padrão variando de 0,03 a 0,10, porém, diferentemente dos resultados expostos da presente pesquisa, Costa *et al.* (2010) e Vieira *et al.* (2010b) observaram uma correlação entre a contagem de *Vibrio* spp. e os valores de pH da água. A justificativa desse fato, segundo Donovan e Netten (1995), é que os vîbrios crescem melhor sob condições alcalinas, portanto o crescimento foi favorecido no ambiente com pH na faixa de 8,4 a 8,6.

Conforme Vieira, Vasconcelos e Carvalho (2007), a quantificação elevada de *Vibrio* spp. nas ostras originárias do estuário do Jaguaribe pode ser explicada, pela descarga de efluentes e carreamento de matéria orgânica para o estuário. A forte presença da atividade de carcinicultura na região e o potencial patogênico apresentado pelos vîbrios à saúde humana devem ser fatores considerados na elaboração de uma legislação clara e específica, que regulamente os níveis dessas bactérias em moluscos e em águas destinadas ao cultivo de organismos aquáticos.

## **5.5 Diversidade bacteriana cultivável**

Das 240 (duzentos e quarenta) cepas isoladas do grupo das BHC em meio PCA, sendo que, para cada estação foram isoladas 120 (50%). Entre esses, 50,1% (122) do total das cepas foi considerado como viável, mas não cultivável (VNC). Essas estirpes tiveram como característica um crescimento primário, sobre a superfície do meio seletivo, mas a não culturabilidade após isolamento. Segundo Pavlov *et al.* (2004) é comum a formação de

colônias bacterianas VNC, entre as populações de BHC, no entanto, a importância dessas bactérias, para a saúde humana é considerada como área de investigações futuras.

Desde 1982 a comunidade científica tem conhecimento de que bactérias metabolicamente ativas, não são capazes de crescer em meios de cultura. Bactérias submetidas a estresses ambientais (escassez de nutrientes, variações de pH, salinidade e temperatura) poderiam entrar em um estado chamado de VNC (THOMPSON; LIDA; SWINGS, 2004). Estas bactérias quando semeadas em meios de cultura convencionais podem ou não voltar ao estado vegetativo (IGBINOSA; OKOH, 2008).

Gonzalez-Acost *et al.* (2006) apontam as bactérias VNC, juntamente com cultiváveis, como participantes ativas na biomineralização da matéria orgânica e biotransformação de minerais, principalmente em manguezais, ecossistemas marinhos altamente produtivos.

Indubitavelmente, a maioria das BHC não é facilmente cultivada usando técnicas microbiológicas convencionais. Já a abordagem através das técnicas de biologia molecular independente de meios de cultura, fornece um quadro mais completo no estudo das comunidades bacterianas (FRIEDRICH *et al.*, 2000; VALLEY *et al.*, 2009).

Das 118 (cento e dezoito) cepas bacterianas que permaneceram viáveis e cultiváveis, 59 (cinquenta e nove) foram Gram-positivas e 59 (cinquenta e nove) Gram-negativas. Segundo Stabili e Cavallo (2011), a abundância elevada de bactérias Gram-positivas em ecossistemas costeiros aquáticos é comum em regiões tropicais e temperadas e em sua pesquisa sobre a composição da comunidade bacteriana da zona costeira da Itália, as Gram-positivas corresponderam há um pouco mais de 25% dos isolados.

Em outro estudo com bivalves (*C. lugubris* e *Perna viridis*) e água circundante, provenientes do Golfo de Nha Trang, no Vietnã, o percentual de Gram-positivas entre os isolados variou de 30 a 50% das BHC (BELENEVA *et al.*, 2007).

Do total de cepas heterotróficas isoladas, duas (2) Gram-positivas e 15 (quinze) Gram-negativas não foram identificadas. Na tabela 5 encontra-se o percentual das linhagens bacterianas isoladas e identificadas, por tipo de amostra. Entre as linhagens de bacterianas Gram-positivas, o maior número de cepas identificadas foi isolado das amostras de TM (14) das OS, seguido pela água (13) da estrutura de cultivo e do TM (12) das OC. Entre as Gram-negativas o maior número de cepas identificadas foi originada das amostras de TM (12) das OC, seguido pelo LI (10) das mesmas, e TM (10) das OS.

Tabela 5 – Distribuição das linhagens identificadas de bactérias heterotróficas cultiváveis Gram-positivas e Gram-negativas por amostras de água, líquido intervalvar e tecidos moles de ostras *Crassostrea rhizophorae* coletadas em uma estrutura de cultivo e em banco natural do estuário do Jaguaribe (Fortim – CE)

| Amostra             | Fonte | Número de cepas de bactérias heterotróficas cultiváveis |             |       |                |             |       | Total (%)    |
|---------------------|-------|---|-------------|-------|----------------|-------------|-------|--------------|
|                     |       | Gram-positivas  |             |       | Gram-negativas |             |       |              |
|                     |       | Bacilo  | Cocos       | (%)   | Bacilo         | Cocobacilos | (%)   |              |
| Água                | EC    | 12  | 1           | 12,9% | 3              | 0           | 3%    | <b>15,8%</b> |
|                     | BN    | 6   | 0           | 5,9%  | 3              | 0           | 3%    |              |
| Tecido mole         | OC    | 10  | 1           | 10,9% | 11             | 1           | 11,9% | <b>22,8%</b> |
|                     | OS    | 13  | 1           | 13,9% | 9              | 1           | 9,9%  |              |
| Líquido intervalvar | OC    | 1   | 2           | 3%    | 10             | 0           | 9,9%  | <b>12,9%</b> |
|                     | OS    | 9   | 1           | 9,9%  | 6              | 0           | 5,9%  |              |
| <b>Total (%)</b>    |       | <b>50,5%</b>  | <b>5,9%</b> |       | <b>41,6%</b>   | <b>2%</b>   |       | <b>100%</b>  |

(%): percentual; EC: estrutura de cultivo; BN: banco natural; OC: ostras cultivadas; OS: ostras selvagens.

Na tabela 6 encontram-se divididos, por tipo de amostra e período do ano, a diversidade bacteriana das linhagens de BHC Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente, obtidas das ostras e águas do entorno de uma estrutura de cultivo e um banco natural, na zona de influência do rio Jaguaribe (Fortim – CE).

Tabela 6 – Distribuição de acordo com as características morfofintoriais e identificação das espécies bacterianas isoladas das amostras de água, líquido intervalvar e tecidos moles ostras (*Crassostrea rhizophorae*), coletadas no estuário do Jaguaribe (Fortim – CE), durante a estiagem e a estação chuvosa

| Período                        | BHC                           | Espécies                         | Fonte de isolamento         |                      |             |       |                     |       |   |
|--------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|----------------------|-------------|-------|---------------------|-------|---|
|                                |                               |                                  | Água                        |                      | Tecido mole |       | Líquido intervalvar |       |   |
|                                |                               |                                  | EC                          | BN                   | OC          | OS    | OC                  | OS    |   |
| Estio                          | G+                            | <i>Bacillus</i> spp.             | 1                           |                      | 2           | 1     | 1                   | 4     |   |
|                                |                               | <i>Corynebacterium</i> spp.      | 4                           | 2                    | 2           |       |                     | 1     |   |
|                                |                               | <i>Listeria</i> spp.             | 1                           |                      |             | 1     |                     |       |   |
|                                | G-                            | <i>Aeromonas</i> spp.            | 1                           | 2                    | 4           | 4     | 6                   | 2     |   |
|                                |                               | <i>Acinetobacter baumannii</i>   |                             |                      | 1           |       |                     |       |   |
|                                |                               | <i>Moraxella lacunata</i>        |                             |                      |             | 1     |                     |       |   |
|                                |                               | <i>Pseudomonas oryzihabitans</i> |                             |                      | 1           |       |                     |       |   |
|                                |                               | <i>Vibrio alginolyticus</i>      |                             |                      | 1           |       |                     | 1     |   |
|                                |                               | <i>V. cholerae</i>               |                             |                      |             |       |                     | 1     |   |
|                                |                               | <i>V. coralliilyticus</i>        |                             |                      |             | 1     |                     |       |   |
|                                |                               | <i>V. vulnificus</i> B1          |                             |                      |             | 1     |                     |       |   |
|                                | Chuvoso                       | G+                               | <i>Bacillus</i> spp.        | 5                    | 2           | 4     | 7                   |       | 2 |
|                                |                               |                                  | <i>Corynebacterium</i> spp. |                      | 1           | 1     | 2                   |       | 2 |
|                                |                               |                                  | <i>Kurthia</i> sp.          | 1                    |             |       | 1                   |       |   |
| <i>Listeria</i> sp.            |                               |                                  |                             |                      | 1           | 1     |                     |       |   |
| <i>Oerskovia</i> sp.           |                               |                                  |                             | 1                    |             |       |                     |       |   |
| <i>Staphylococcus</i> spp.     |                               |                                  | 1                           |                      | 1           | 1     | 2                   | 1     |   |
| Chuvoso                        |                               |                                  | G-                          | <i>Aeromonas</i> sp. |             |       | 1                   |       |   |
|                                | <i>Citrobacter freundii</i>   |                                  |                             | 1                    |             |       |                     |       |   |
|                                | <i>Escherichia coli</i>       |                                  |                             |                      |             | 1     |                     |       |   |
|                                | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |                                  |                             |                      |             | 1     |                     | 1     |   |
|                                | <i>V. alginolyticus</i>       |                                  |                             |                      |             |       | 2                   | 1     |   |
|                                | <i>V. ichthyoenteri</i>       | 1                                |                             |                      |             |       |                     |       |   |
|                                | <i>V. litoralis</i>           |                                  |                             |                      |             | 1     |                     |       |   |
|                                | <i>V. mediterranei</i>        |                                  |                             |                      | 1           |       |                     |       |   |
|                                | <i>V. metschnikovii</i>       |                                  |                             |                      |             |       |                     | 1     |   |
|                                | <i>V. navarrensis</i>         |                                  |                             |                      | 1           |       |                     |       |   |
|                                | <i>V. ordalii</i>             |                                  |                             |                      |             |       | 1                   |       |   |
|                                | <i>V. parahaemolyticus</i>    |                                  |                             |                      | 1           |       |                     |       |   |
|                                | <i>V. pelagius</i> II         |                                  |                             |                      | 1           |       |                     |       |   |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | 1                             |                                  |                             |                      |             |       |                     |       |   |
| <b>Total</b>                   |                               |                                  | 16                          | 9                    | 23          | 24    | 12                  | 17    |   |
| <b>Percentual</b>              |                               |                                  | 15,9%                       | 8,9%                 | 22,8%       | 23,8% | 11,9%               | 16,7% |   |

EC: estrutura de cultivo; BN: banco natural; OC: ostras cultivadas; OS: ostras selvagens; G+: Gram-positiva; G-: Gram-negativa.

Entre as estirpes Gram-positivas foram identificadas 57 (cinquenta e sete) cepas até o nível de gênero: *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Kurthia*, *Listeria*, *Oerskovia* e *Staphylococcus*; e entre as Gram-negativas foram identificadas 44 (quarenta e quatro), distribuídas em oito (8) gêneros: *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Moraxella*, *Vibrio* e *Yersinia*. A microbiota encontrada nas amostras de ostras e águas circundantes é similar a descrita por Hatha *et al.* (2005), em amostras de moluscos de água doce (*Batissa violacea*) coletados na ilha de Fiji, na Oceania.

De acordo com Paillard, Roux, Borrego (2004) e Pujalte *et al.* (1999), os bivalves abrigam uma rica microbiota comensal composta de várias espécies, principalmente pertencentes ao gênero *Bacillus*, *Micrococcus*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Aeromonas* e *Flavobacterium*. Algumas destas estirpes são patógenos oportunistas tendo as condições ambientais como regulador dessa interação.

Os resultados encontrados estão em conformidade com as observações de Stabili e Cavallo (2011), que mencionaram a predominância de *Bacillus* entre as bactérias Gram-positivas isoladas de águas costeiras da Itália.

Outras pesquisas já relacionaram os gêneros *Aeromonas* e *Bacillus* entre os isolados dominantes na microbiota de moluscos bivalves (BELENEVA *et al.*, 2007; CAVALLO; ACQUAVIVA; STABILI, 2009). O gênero *Bacillus* spp. é reconhecido como parte da população bacteriana indígena de ostras, representando de 30 a 70% (KIM, H.-J. *et al.*, 2011) e faz parte da microbiota natural do trato gastrointestinal de diversos animais marinhos, o que favorece a sua utilização como probiótico em atividades de aquicultura (LUIS-VILLASEÑOR *et al.*, 2011; RAHIMAN *et al.*, 2010; RAVI *et al.*, 2007).

O gênero *Corynebacterium* foi o segundo gênero mais isolado e foi detectado em amostras de água e tecidos. São consideradas bactérias comensais do homem e animais, no entanto, algumas são potenciais patógenos (GRAEVENITZ; BERNARD, 2006), mas raramente causam infecções (MARTINEZ; TRABULSI, 2008a). A presença deste gênero também foi detectada em ostras da espécie *C. gigas*, na China (RONG *et al.*, 2010).

*Staphylococcus* foi o terceiro gênero mais isolado das amostras (ostra e água) pertencente às Gram-positivas. A presença de *Staphylococcus* spp. em ostras também foi confirmada por Kim, H.-J. *et al.* (2011a) na Coreia, cujos autores ressaltam esse gênero bacteriano como parte da microbiota natural de ostras, podendo representar 20% dos isolados cultiváveis. Na China, Rong *et al.* (2010) mencionaram em ostras (*C. gigas*) percentual mais moderado de *Staphylococcus* spp., apenas 3%. Rodriguez, Hariharan e Nimrod (2011) também relataram a presença desse gênero na microbiota de moluscos no Caribe. Da mesma

forma este micro-organismo foi detectado por Eduok *et al.* (2010) em ostras do mangue (*C. tulipa*), na Nigéria. Segundo Lin, C.-S. *et al.* (2012a) *Staphylococcus* spp. são bactérias halotolerantes, e isso permite ao gênero uma diversidade de *habitats*. Conforme Guan, Cho e Lee (2011), a maioria das espécies do gênero *Staphylococcus* é inofensiva e habita o solo podendo normalmente residir na pele e membranas mucosas de muitos animais, incluindo seres humanos.

Outros isolados foram identificados como pertencentes aos gêneros *Listeria*, *Kurthia* e *Oerskovia*, que têm em comum a característica de ampla distribuição nos ambientes naturais (INDU *et al.*, 2006; LEVY *et al.*, 2000; STACKEBRANDT *et al.*, 2002). As espécies pertencentes a esses gêneros, normalmente estão relacionadas a amostras ambientais e animais aquáticos, mas não existem relatos sobre o papel patogênico para humanos ou animais, com exceção da *L. monocytogenes* um patógeno reconhecido para os seres humanos (NORHANA *et al.*, 2010).

Matyar, Kaya e Dinçer (2008) detectaram 87,5% (7) dos gêneros bacterianos pertencentes ao grupo morfotintorial das Gram-negativas citadas anteriormente, com exceção apenas de *Moraxella*, em isolados de amostras de sedimento, água, e camarões da Baía de Iskenderun, na costa sul da Turquia.

Dentre as BHC Gram-negativas, *Aeromonas* (45,5%) e *Vibrio* (36,4%) foram os gêneros com maior frequência de isolamento. Os outros gêneros identificados foram: *Pseudomonas* (6,8%), *Acinetobacter* (1,3%), *Moraxella* (1,3%), *Citrobacter* (1,3%), *Escherichia* (1,3%), e *Yersinia* (1,3%), estes três últimos pertencem à família Enterobacteriaceae. Entre as estirpes Gram-negativas identificadas, apenas aqueles pertencentes ao gênero *Aeromonas* não foram classificadas até o nível de espécie.

Os gêneros *Aeromonas* e *Vibrio* foram os mais frequentemente identificados com técnicas genotípicas em enguias doentes e amostras ambientais de mariculturas chinesas (ZENG *et al.* 2010). Segundo Lafisca *et al.* (2008), *Vibrio* e *Aeromonas* são micro-organismos patogênicos ao homem e animais, e habitam naturalmente os ecossistemas aquáticos, por isso são encontrados com maior frequência.

Os resultados encontrados estão em conformidade com as observações de Stabili e Cavallo (2011) que mencionaram maior ocorrência de *Aeromonas* spp. entre os isolados de água costeiras da Itália, e a presença marcante de *Vibrio* spp., *Pseudomonas* spp. e de membros da família Enterobacteriaceae.

A frequência do isolamento de *Aeromonas* spp., nas amostras de ostra e na água circundante é explicada pelo fato dessas bactérias serem autóctones de ambientes de água

doce e salobra (NAWAZ *et al.*, 2006; RODRIGUEZ; HARIHARAN; NIMROD, 2011; SCHMIDT *et al.*, 2001). Porém algumas espécies deste gênero são consideradas como importantes patógenos humanos responsáveis por DTAs (KIROV, 1993; MURRAY; ROSENTHAL; PFAÜER, 2006). Yano *et al.* (2011) observaram *Aeromonas* spp. isoladas de camarões em cultivos na Tailândia, com elevado nível de resistência a OTC.

No Brasil, Evangelista-Barreto *et al.* (2010) relataram a quantificação de *Aeromonas* spp. variando de <10 a  $1,4 \times 10^4$  CFU/mL, em amostras de água do estuário do rio Cocó, Estado do Ceará, e a identificação das espécies: *Aeromonas caviae*, *A. veronii* bv. *sobria*, *A. veronii* bv. *veronii*, *A. trota*, *A. media*, *A. sobria* e *A. hydrophila*. No mesmo estuário, Silva (2009) menciona a ocorrência na água das espécies *A. caviae*, *A. sobria*, *A. trota*, *A. salmonicida* e *A. allosacharophyla*.

Entre as espécies de *Vibrio* identificadas, *V. alginolyticus* foi o mais frequente. Essa bactéria é um importante patógeno de animais (ITTOOP *et al.*, 2010; LAFISCA *et al.*, 2008) e seres humanos (CHEN *et al.*, 2011; LIN, Y.-R. *et al.*, 2012). Esta espécie pode causar infecções em ferimentos expostos a águas contaminadas, podendo ocasionar septicemia ou até mesmo a morte (OZER *et al.*, 2008). Este vibrião já foi citado como o principal patógeno entre os isolados de moluscos bivalves (*C. lugubris* e *Perna viridis*), no Vietnã (BELENEVA *et al.*, 2007). A mesma bactéria foi a mais frequentemente isolada entre bivalves na Lagoa de Venice (Itália) e Baía de Guanabara (LAFISCA *et al.*, 2008).

Autores como Mechri *et al.* (2011) também relataram a dominância de estirpes de *V. alginolyticus* (54,8%), entre os víbrios isolados de amostras de bivalves (*Ruditapes decussatus*) e águas, no Golfo de Gabes, costa sul da Tunísia. Situação semelhante aconteceu em Granada, no Caribe, onde a espécie supracitada foi a mais frequente (72,7%) entre as Vibrionaceae, em moluscos, especificamente amêijoas (*Mercenaria mercenaria*), ostras (*Isognomon isognomon*), conchas rainhas (*Strombus gigas*) e búzios (*Cittarium pica*) (RODRIGUEZ; HARIHARAN; NIMROD, 2011).

Estirpes como *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. metschnikovii* e *V. vulnificus* são, a nível mundial, constantemente detectadas em ambientes estuarinos influenciados pela atividade de carcinicultura (MANIVASAGAN *et al.*, 2010). No Brasil, a mesma situação foi verificada em diversas áreas concentradoras de atividade de cultivo de camarões marinhos. Na costa cearense, as espécies patogênicas como *V. carchariae*, *V. cholerae*, *V. harveyi*, *V. metschnikovii*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* foram detectadas nos estuários do rio Cocó (VIEIRA *et al.*, 2010b), rio Coreau (COSTA *et al.*, 2010), rio Choró, rio Jaguaribe e rio Pirangi (SOUSA *et al.*, 2006) e rio Pacoti (SOUSA *et al.*, 2004).

Outra espécie do gênero *Vibrio* foi *V. parahaemolyticus*, detectado apenas nos TM das OC, durante o período chuvoso. A presença de *V. parahaemolyticus* em ostras já foi documentada no Brasil (VIEIRA *et al.*, 2010b), Egito (MERWAD; EL-GHAREEB; TAISIR, 2011), Estados Unidos (MCLAUGHLIN *et al.*, 2005; WARD; BEJ, 2006), México (REYES-VELÁZQUEZ *et al.*, 2010), Taiwan (NOORLIS *et al.*, 2011), em bivalves no Brasil (LAFISCA *et al.*, 2008; ROJAS *et al.*, 2011), China (CHAO *et al.*, 2009), Itália (LAFISCA *et al.*, 2008), assim como em estações de tratamentos de água residuais da zona rural na África do Sul (IGBINOSA; OBI; OKOH, 2009).

Conforme Noorlis *et al.* (2011), *V. parahaemolyticus* é uma bactéria patogênica ao homem, em função principalmente da síntese da toxina TDH responsável por gastroenterites. Na China, cepas de *V. parahaemolyticus* TDH positivas foram encontrados em pescados crus e cozidos, assim como nas fezes de pessoas que fizeram o consumo dos mesmos (CHAO *et al.*, 2009). Merwad, El-Ghareeb e Taisir (2011) também detectaram os genes dessa toxina em ostras e em fezes de pessoas com diarreia. No Brasil, Vieira *et al.* (2011) detectaram *V. parahaemolyticus* TDH e TRH positivos isolados de ostras frescas comercializadas em Fortaleza, Estado do Ceará. Os genes *tdh* e *trh*, responsáveis por quadros de diarreias em humanos, foram detectados em cepas de *V. parahaemolyticus*, isoladas de moluscos bivalves cultivados na costa mediterrânica espanhola (ROQUE *et al.*, 2009). A presença dessa espécie nos tecidos de ostras representa um risco para os consumidores desse tipo de alimento.

Entre as BHC Gram-negativas, *V. metschnikovii* foi isolado apenas no período chuvoso do LI das OC. A presença dessa bactéria em ostras já foi relatada por Cao *et al.* (2010). Segundo Matté *et al.* (2007) esta espécie de vibrio habita naturalmente ecossistemas aquáticos, podendo ser isolada a partir de frutos do mar, e em alguns casos, está associada a doenças antrópicas. Linde *et al.* (2004) afirmam que esta bactéria possui grande atividade hemolítica e pode ocasionar infecções humanas.

Um (1) único isolado de *V. cholerae* foi encontrado na amostra de LI das OS, durante a estiagem. Segundo Sousa *et al.* (2004), esse patógeno pode ser encontrado em ambientes aquáticos como livre nadantes ou associados a organismos. Diferentemente deste estudo, os autores isolaram o *V. cholerae* de OS, durante o período chuvoso, quando a salinidade esteve mais baixa. Em larvas de ostras, *V. cholerae* apresenta alta toxicidade atribuída à produção de metaloproteases (HASEGAWA *et al.*, 2009), representando um risco à atividade de malacocultura.

Peixes e mariscos podem transmitir a cólera, porém a maior incidência é dada pelo consumo de pescados crus. A ausência de *V. cholerae* O1 e O139 é determinada para

alimentos. É importante salientar que, mesmo apresentando um potencial menor de patogenicidade, cepas de *V. cholerae* não O1 e não O139 representam um risco para a saúde pública (DALSGAARD, 1998).

Outra espécie potencialmente patogênica isolada foi *V. vulnificus* biótipo 1, detectado apenas na amostra de TM das OS, durante o período de estio. Essa bactéria é conhecida por ocasionar doenças em animais marinhos cultivados e no homem (IGBINOSA; OKOH, 2008; PARANJPYE; STROM, 2005). O biótipo 1 está relacionado, principalmente, a infecções humanas relacionadas à manipulação ou consumo de mariscos crus (BISHARAT *et al.*, 2007).

Nos Estados Unidos *V. vulnificus* é responsável por 95% de natimortos em organismos marinhos, e por uma taxa de mortalidade >50% entre animais aquáticos infectados (LOPEZ-JOVEN; ROQUE; OLIVER, 2009). Essa espécie, segundo os autores, possui dois (2) genótipos, o C isolado de casos clínicos e o E, isolado a partir de fontes ambientais, ambos capazes de sobreviver em ostras, sobrevivendo em temperaturas de 4 e 22 °C, porém o genótipo E, quando comparado ao outro, além de ser mais comum entre os isolados de ostra, possui vantagens seletivas em temperaturas baixas.

Lipp, Rodriguez-Palacios e Rose (2001) reconhecem *V. vulnificus* como um importante patógeno humano, frequentemente isolado de corpos d'água e sedimentos da costa. Sua frequência é influenciada pela temperatura e, principalmente, pela salinidade em regiões tropicais, apresentando uma correlação positiva em ambientes com salinidade  $\geq 15$ . Chatzidaki-Livanis *et al.* (2006) relatam que *V. vulnificus* é responsável por raras septicemias de ocorrência fatal, ocasionadas pelo consumo de ostra crua, por pessoas com insuficiência hepática ou imunológica.

Esse vibrião já foi detectado em ostras no Brasil (PEREIRA *et al.*, 2007; PEREIRA; VIANA; RODRIGUES, 2007; VIEIRA *et al.*, 2010b), Coréia (KIM, J. H. *et al.*, 2011), Egito (MERWAD; EL-GHAREEB; TAISIR, 2011) e Estados Unidos (HAN *et al.*, 2007; PRAPAIWONG; WALLACE; ARIAS, 2009), em bivalves na Tunísia (MECHRI *et al.*, 2011), em ambientes costeiros (água ou sedimento) na Coréia (KIM, J. H. *et al.*, 2011), Egito (MERWAD; EL-GHAREEB; TAISIR, 2011), Índia (MANIVASAGAN *et al.*, 2010), Iran (AMIRMOZAFARI; FOROHESH; HALAKOO, 2005), Itália (ZANETTI *et al.*, 2001), Tunísia (MEJDI *et al.*, 2011) e Vietnã (BELENEVA *et al.*, 2007).

A infecção por *V. vulnificus* é geralmente adquirida pelo consumo de ostras contaminadas, ou por exposição de ferimentos a águas costeiras. Exposições típicas incluem ferimentos adquiridos durante a abertura de uma ostra, ou em um acidente de barco. Feridas

podem ser infectadas, até mesmo em hospedeiros saudáveis. No entanto, as manifestações mais graves são observadas em pessoas imunodeprimidas (MORRIS JR *et al.*, 2003).

Chatzidaki-Livanis *et al.* (2006) estudaram as distinções genéticas entre cepas de *V. vulnificus* de fontes ambientais e clínicas, e observaram uma (1) cepa oriunda de ostras com perfil clínico capaz de atuar como patógeno em humanos. Os autores concluíram que a abundância das cepas de *V. vulnificus* em ostras, pode viabilizar a presença de cepas potencialmente patogênicas.

Outro vibrio conhecido por causar enfermidades em moluscos e peixes, e que pode ser encontrado em associação com outros organismos marinhos espalhados pelo mundo (BULLER, 2004) é *V. ordalii*. Na presente pesquisa essa espécie foi isolada apenas nas amostras de LI das OC, durante a estação chuvosa.

Enquanto, *V. pelagius* II esteve presente em uma (1) amostra de TM das OC, durante o período chuvoso. O isolamento dessa espécie em ostras saudáveis já foi descrito na Austrália (GIBSON; WOODWORTH; GEORGE, 1998), Espanha (PUJALTE *et al.*, 1999) e Brasil (VIEIRA *et al.*, 2010b), porém nada se sabe da sua patogenicidade em moluscos. Contudo, *V. pelagius* foi responsável pela mortalidade em massa de larvas e pós-larvas de peixes (*Scophthalmus maximus*) na Espanha, mas nenhuma patogenia foi verificada entre peixes dessa espécie no estágio juvenil (VILLAMIL *et al.*, 2003). A patogenicidade desses micro-organismos foi relacionada à produção de uma protease extracelular com atividades endopeptídica e exopeptídica (FARTO *et al.*, 2002).

*V. coralliilyticus* foi isolado somente no TM das OS, durante a estiagem. A espécie não apresenta patogenicidade ao homem e pode ser encontrada facilmente em ecossistemas costeiros (CARVALHO, 2009; MUNN; MARCHANT; MOODY, 2008; REMILY; RICHARDSON, 2006; VIEIRA *et al.*, 2010a) e a presença em ostras já foi mencionada por Ben-Haim *et al.* (2003).

As outras espécies de vibrios (*V. ichthyenteri*, *V. littoralis*, *V. mediterranei*, *V. navarrensis*) isoladas do meio PCA, encontram-se distribuídas em ecossistemas aquáticos, e até o momento não foram relacionadas a eventos de doenças humanas ou de animais (BULLER, 2004; SUGITA; ITO, 2006). A presença dessas espécies em áreas costeiras concentradoras de atividade de aquicultura, no Estado do Ceará, já foi mencionada anteriormente por Carvalho (2009), Menezes (2011), Rebouças *et al.* (2011) e Vieira *et al.* (2010a).

De acordo com Campa-Córdova *et al.* (2009) *Pseudomonas* spp. podem ser encontradas em solo, água e ambientes costeiros. A produção de uma gama de metabólitos

secundários relacionados a estirpes desse gênero, fez com que fossem utilizadas como probiótico na aquicultura, principalmente, no combate a vibrioses. *Pseudomonas aeruginosa* é conhecida como patógeno humano (HEARST *et al.*, 2009) e por produzir metaloproteases (fator de virulência), como a elastase, porém quando submetida a um teste de toxicidade em larvas de ostras, a taxa de mortalidade foi considerada mínima (ca. 13%), em comparação com as espécies de víbrios (HASEGAWA *et al.*, 2009).

Aguilar-Macías *et al.* (2010) sabendo que o gênero *Pseudomonas* possui espécies bacterianas comensais em ostras, sem efeitos negativos para o hospedeiro, testaram a ação probiótica de *P. aeruginosa* em conjunto com *Burkholderia cepacia*, em incubadoras de larvas de ostras (*Pinctada mazatlanica*), no México, e registraram o aumento da sobrevivência (55-65%), da altura da concha (55-58%), e do peso molhado (70-76%), em relação ao grupo controle.

A presença de *Escherichia coli* (2,3%) foi confirmada nas amostras, no entanto, esta bactéria é exógena desse tipo de ambiente, tendo o trato gastrointestinal de animais homeotérmicos como *habitat* primário, e a presença em ecossistemas aquáticos denota uma contaminação de origem fecal (FERNANDEZ-DELGADO; SUAREZ, 2009; MARTINEZ; TRABULSI, 2008b). Entretanto, esse grupo apresenta pouca resistência em ambiente aquáticos salino e salobro, principalmente devido à ação deletéria dos íons de sódio e à ação da luz ultravioleta (VIEIRA, R. H. S. F. *et al.*, 2001), reduzindo seu número em ambientes costeiros. Eduok *et al.* (2010) citam a *E. coli*, como um micro-organismos de baixa frequência em água marinhas, e que isto acontece devido à sua rápida eliminação nestes ecossistemas, enquanto outras bactérias patogênicas de efluentes de esgoto podem sobreviver por longos períodos nessas águas.

Conforme Hoffmann (2001), *Yersinia enterocolitica* pode habitar corpos d'água, pequenos roedores, animais de estimação, e principalmente suínos. Entre os alimentos veiculadores dessa bactéria se destaca a carne de suínos e seus derivados, ostras e demais pescados (BAPTISTA; VENÂNCIO, 2003; TEODORO *et al.*, 2006; VEIGA *et al.*, 2009). É uma espécie patogênica, responsável por várias síndromes gastrointestinais, e sua presença em ostras apresenta risco potencial ao consumidor.

Segundo alguns autores, os gêneros *Acinetobacter* (EDUOK *et al.*, 2010; HATHA *et al.*, 2005; KUEH; CHAN, 1985; PUJALTE *et al.*, 1999; RONG *et al.*, 2010), *Moraxella* (RODRIGUEZ; HARIHARAN; NIMROD, 2011; RONG *et al.*, 2010), *Citrobacter* (EDUOK *et al.*, 2010) fazem parte da microbiota natural de ostras. No entanto, as espécies *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii* e *Moraxella lacunata*, isoladas das amostras

de água e TM de ostras, representam risco à saúde, pois são consideradas potencialmente patogênicas ao homem (ANVISA, 2004).

De acordo com Fernandez-Delgado e Suarez (2009), a presença de bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae (*E. coli* e *C. freundii*), em águas costeiras e ou em TM das ostras, podem ser atribuídas à drenagem dos corpos de água contaminados, o que pode aumentar durante a estação chuvosa. Esta afirmação respalda os resultados do presente estudo, cujos três (3) membros da família supracitada foram detectados apenas durante este período.

*Bacillus* e *Staphylococcus* foram os gêneros do grupo das BHC Gram-positivas, que apareceram nas três (3) amostras da estrutura de cultivo, *Listeria* e *Corynebacterium* estavam presentes apenas nas amostras de água e TM, e *Kurthia* somente na água circundante das OC. Quanto às BHC Gram-negativas, *Aeromonas* e *Vibrio* foram encontrados também nas três (3) amostras. Além destes, *Pseudomonas* (8,3%) e *Acinetobacter* (8,3%) estavam presentes apenas nas amostras do TM (12 cepas) das OC e *Yersinia* (33,3%) na água (3 cepas) circundante das OC.

A microbiota encontrada em ostra, mexilhões e água circundante no Vietnã, foram similares aos resultados descritos (BELENEVA *et al.*, 2007). Os autores citam *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, além de membros da família Enterobacteriaceae entre os principais isolados, e adverte que espécies patogênicas presentes nesses gêneros podem causar doenças em moluscos cultivados, e que há um risco de serem transferidos para os seres humanos através do consumo desses animais.

Os resultados de Eduok *et al.* (2010), contribuíram com a presente pesquisa. Os mesmos autores isolaram *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Listeria*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Vibrio*, nas ostras e em água do riacho Douglas, na Nigéria, contribuindo com 46,7% (7) do total da diversidade encontrada.

Nas BHC Gram-positivas *Bacillus* e *Corynebacterium* estavam presentes nas três (3) amostras, e *Staphylococcus* apenas no TM e LI das OS. Os gêneros *Listeria* e *Kurthia* foram exclusivos dos TM das OS, e *Corynebacterium* da água do banco natural. Ao contrário da estrutura de cultivo, no banco natural *Aeromonas* foi o único gênero difundido nas três (3) amostras das BHC Gram-negativas. *Pseudomonas* e *Vibrio* foram isoladas tanto do TM quanto do LI das OS, e alguns gêneros neste estudo, como é o caso de *Moraxaela* (10%) e *Escherichia* (10%) no TM e *Citrobacter* (33,3%) na água, foram exclusivos para algumas amostras.

Entre linhagens Gram-positivas e Gram-negativas, a maior diversidade na estrutura de cultivo foi encontrada nas amostras de TM e água, ambas com oito (8) gêneros, entretanto o maior número de isolados identificados foi nas amostras de TM das OC com 23 (vinte e três) cepas.

No banco natural, a diversidade foi maior nos TM das OS, com dez (10) gêneros bacterianos presentes. O LI das OS ficou em segundo lugar com seis (6) gêneros e a água, apenas com cinco (5). O maior número de isolados identificados competiu ao TM das OS com 18 (dezoito) cepas no total.

Assim, considerando as amostras dos dois (2) locais de coletas, foram as bactérias de TM das OS, que apresentaram a maior diversidade a nível de gênero, e os TM das OC o maior número de isolados identificados. Segundo Saulnier *et al.* (2010) elas podem associar-se ao TM das ostras, por conta das diversas relações ecológicas existentes, podendo ser comensais, patogênicas, mutualistas ou até mesmo por coincidência, devido ao comportamento de alimentação, que ocorre por filtragem em bivalves.

Os resultados obtidos corroboram com as observações de vários outros autores (PUJALTE *et al.*, 1999; VALLEY *et al.*, 2009; VIEIRA; VASCONCELOS; CARVALHO, 2007), que mencionaram uma superioridade em número e diversidade de BHC das amostras de ostras sobre às das águas circundantes.

De acordo com Pruzzo, Gallo e Canesi (2005), o ambiente costeiro abriga uma diversidade bacteriana com adaptações a colonizar bivalves, e que fatores abióticos e antrópicos podem modular o quadro microbiológico nesses animais. Contudo, assim como os demais organismos, as ostras possuem mecanismos de defesas, presentes na hemolínfa, capazes de combater estes micro-organismos, e que esta linha de defesa é alterada conforme o estado de saúde do animal.

Os resultados mostraram que exceto por alguns gêneros, a biodiversidade de bactérias da *C. rhizophorae* refletia a da água circundante, e isto também é comprovado em diversos estudos sobre a diversidade bacteriológica em bivalves (BELENEVA *et al.*, 2007; CAVALLO; ACQUAVIVA; STABILI, 2009; PUJALTE *et al.*, 1999).

Alguns gêneros foram encontrados apenas nas *C. rhizophorae*, e segundo Lyons *et al.* (2007), não somente a água mas agregados enriquecidos de agentes patogênicos podem viabilizar a transmissão destes para a ostra, principalmente devido à forma de alimentação, pois são animais filtradores, e captam seu alimento através da matéria em suspensão na coluna d'água.

O maior percentual de cepas identificadas e diversidade de gêneros das BHC Gram-positivas isoladas das amostras de água, LI e TM de ostras *C. rhizophorae*, foi durante o período chuvoso, com 64,3% (36) contra 35,7% (20) no período de estio e 66,7% (6) contra 33,3%, (3).

*Bacillus* e *Corynebacterium* foram os gêneros mais encontrados em ambas as estações, com 45% dos isolados durante a estiagem para cada, e 55,6% e 16,7% na estação chuvosa, respectivamente. A porcentagem (16,7%) de estafilococcus presente apenas neste período foi a mesma que a do gênero *Corynebacterium*.

O maior percentual de cepas identificadas das BHC Gram-negativas isoladas das amostras de água, LI e TM de ostras *C. rhizophorae*, foi na estiagem, com 61,4% (27) contra 38,6% (17), do período chuvoso. Contudo o maior número de gêneros bacterianos isolados 54,5% (6), foi observado na estação chuvosa e no período de estio 45,5% (5).

Outra observação pertinente deve ser considerada, *Aeromonas* e *Vibrio* foram os dois (2) gêneros mais abundantes entre as linhagens Gram-negativas, contudo, se apresentaram de forma sazonal, sendo que *Aeromonas* corresponderam a 70,4% dos isolados do período de estio, e os vibriões a 64,7% durante a estação chuvosa.

Assim como nas contagens de BHC, não houve diferença significativa entre as estações com relação o número de gêneros de bactérias Gram-negativas, entretanto não foi a mesma realidade para as Gram-positivas, que durante a estação chuvosa se apresentaram com maior predominância (66,7%, 6).

Ao analisar-se a diversidade quanti e qualitativa de víbrios utilizando meios de cultivo seletivo para o grupo, constata-se que, foram isoladas 133 (cento e trinta e três) colônias de *Vibrio* spp., das quais 56 (42,1%) e 77 (57,9%) foram provenientes, respectivamente, do período de estio e chuvoso. Contudo apenas 68 (51,1%) (TABELA 6) cepas foram identificadas como espécies pertencentes ao gênero *Vibrio*, visto que, 65 (48,9%) cepas foram diagnosticadas como VNC, sendo 29 (21,8%) e 36 (27,1%) dos períodos de estio e chuvoso, respectivamente.

O percentual das cepas VNC (48,9%), que não foi identificada foi muito próximo aos das identificadas (51,1%). Entretanto, o grupo de bactérias formado por células VNC podem resguardar informações preciosas a respeito da diversidade e patogenicidade dos micro-organismos ali presentes. Segundo Baffonea *et al.* (2003) espécies de *Vibrio*, mesmo no estado VNC, podem penetrar no corpo humano, através da ingestão ocasional de águas contaminadas em atividade de lazer (balneabilidade), ou de frutos do mar crus, e as células

VNC alocadas no intestino podem encontrar um *habitat* ideal. Ao retornar ao estado vegetativo, elas são capazes de reativar seu potencial patogênico e causarem doenças.

Experimentos realizados no Reino Unido, com víbrios isolados de corais doentes, fizeram com que cepas de *V. shiloi* fossem induzidas ao estado VNC. Isto decorreu de um longo processo de escassez de alimento (126 dias) e redução da temperatura (4 °C). Ao adicionar nutrientes, as culturas voltaram ao estado vegetativo (VATTAKAVEN *et al.*, 2006). Esta experiência serviu para explicar a alta frequência de cepas encontradas no estado VNC, pois as mesmas, quando não encontram o meio favorável para o seu desenvolvimento, podem passar de um estado para outro.

A diversidade de víbrios cultiváveis nos tecidos das ostras e na água circundante, nas áreas de coletas de ostras, foi avaliada separadamente através de isolamento com meio seletivo para esse grupo bacteriano. Na tabela 7, encontram-se divididos por tipo de amostra e período do ano, a diversidade de *Vibrio* spp. obtidos das ostras e água de entorno na zona de influência do rio Jaguaribe (Fortim – CE). Dentre os *Vibrio* identificados, a maior incidência recaiu sobre as espécies: *V. ruber* (25%), *V. coralliilyticus* (16,2%), *V. alginolyticus* (8,8%), *V. pectenocida* (7,3%), *V. tasmaniensis* (7,3%), *V. littoralis* (5,9%), *V. navarrensis* (5,9%), e outros com números inferiores ou iguais a duas (2) cepas.

Nove (9) das espécies de *Vibrio* identificadas nesta pesquisa foram anteriormente citadas como frequentes em amostras de água e sedimento, coletadas em áreas de cultivo de camarão marinho no Estado do Ceará, Brasil (VIEIRA *et al.*, 2010a). Essa ocorrência das mesmas espécies em diversos locais pode ser devido à constante troca da microbiota das fazendas com os estuários, pela captação de água do afluente e despesca de camarões (efluente).

Em três (3) fazendas de camarões, no litoral de Pernambuco, foi pesquisada a diversidade de *Vibrio* spp., das amostras de água, camarão (*Litopenaeus vannamei*), hepatopâncreas e hemolínfa, e foram identificadas 14 (quatorze) espécies distintas (MENDES *et al.*, 2009). Esses resultados mostram o quanto é rica a diversidade de *Vibrio* spp., presente nas ostras e águas circundantes, uma vez que foi obtido o número de 20 (vinte) espécies em Fortim.

Tabela 7 – Distribuição do número de cepas de *Vibrio* spp. por amostras de água, líquido intervalvar e tecidos moles de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) obtidas em uma estrutura de cultivo e um banco natural, no estuário do Jaguaribe (Fortim – CE), durante a estiagem e a estação chuvosa

| Período                | Espécies                  | Fonte de isolamento |             |              |              |                     |             |
|------------------------|---------------------------|---------------------|-------------|--------------|--------------|---------------------|-------------|
|                        |                           | Água                |             | Tecido mole  |              | Líquido intervalvar |             |
|                        |                           | EC                  | BN          | OC           | OS           | OC                  | OS          |
| Estio                  | <i>V. agarivorans</i>     |                     |             |              |              |                     | 1           |
|                        | <i>V. alginolyticus</i>   |                     |             | 2            | 1            | 2                   | 1           |
|                        | <i>V. calviensis</i>      |                     |             |              | 1            |                     |             |
|                        | <i>V. coralliilyticus</i> |                     |             | 1            |              | 2                   | 1           |
|                        | <i>V. diabolicus</i>      |                     |             |              |              | 1                   |             |
|                        | <i>V. fisheri</i>         | 1                   |             |              |              |                     |             |
|                        | <i>V. harveyi</i>         | 1                   |             |              |              |                     |             |
|                        | <i>V. littoralis</i>      | 1                   | 1           |              |              |                     |             |
|                        | <i>V. metschnikovii</i>   |                     |             | 1            |              |                     |             |
|                        | <i>V. mimicus</i>         |                     |             |              | 1            |                     |             |
|                        | <i>V. natriegens</i>      |                     | 1           |              |              |                     | 1           |
|                        | <i>V. pectenocida</i>     |                     | 1           |              |              |                     |             |
|                        | <i>V. ruber</i>           |                     | 1           |              |              |                     |             |
|                        | <i>V. susperstes</i>      |                     |             | 1            |              |                     |             |
|                        | <i>V. tasmaniensis</i>    |                     |             |              | 2            |                     |             |
|                        | <i>V. vulnificus</i> B2   |                     |             | 1            |              |                     |             |
| Percentual             |                           | 4,4%                | 5,9%        | 8,8%         | 7,4%         | 7,4%                | 5,9%        |
| Chuvoso                | <i>V. agarivorans</i>     |                     |             |              |              | 1                   |             |
|                        | <i>V. calviensis</i>      |                     |             | 1            |              |                     |             |
|                        | <i>V. campbellii</i>      |                     |             | 1            |              |                     |             |
|                        | <i>V. coralliilyticus</i> |                     |             | 3            | 1            | 3                   |             |
|                        | <i>V. fortis</i>          |                     |             | 1            |              |                     |             |
|                        | <i>V. ichthyenteri</i>    | 1                   |             |              |              |                     |             |
|                        | <i>V. littoralis</i>      |                     |             | 1            | 1            |                     |             |
|                        | <i>V. navarrensis</i>     |                     |             |              | 3            | 1                   |             |
|                        | <i>V. pectenocida</i>     |                     |             | 2            | 2            |                     |             |
|                        | <i>V. ruber</i>           | 2                   |             | 6            | 3            | 5                   |             |
| <i>V. tasmaniensis</i> |                           |                     | 1           |              | 2            |                     |             |
| Percentual             |                           | 4,4%                | 0%          | 23,5%        | 14,7%        | 17,6%               | 0%          |
| <b>Total</b>           |                           | <b>6</b>            | <b>4</b>    | <b>22</b>    | <b>15</b>    | <b>17</b>           | <b>4</b>    |
| <b>Percentual</b>      |                           | <b>8,8%</b>         | <b>5,9%</b> | <b>32,4%</b> | <b>22,1%</b> | <b>25%</b>          | <b>5,9%</b> |

EC: estrutura de cultivo; BN: banco natural; OC: ostras cultivadas; OS: ostras selvagens.

No Brasil, a presença das bactérias *Vibrio parahaemolyticus*, *V. carchariae*, *V. alginolyticus* e *V. vulnificus* em ambiente aquático, particularmente salino e salobro, e em alimentos de origem marinha, foi relatada em estudos pretéritos (ARCHER; MORETTO, 1994; MORAES *et al.*, 2000; PEREIRA; VIANA; RODRIGUES, 2004, 2007).

Paillard, Roux e Borrego (2004) afirmam que *Vibrio* spp. surgem como um dos principais agentes etiológicos de doenças em bivalves, e a propagação deste e de outros patógenos na malacocultura é influenciada, prioritariamente, pelo aquecimento dos oceanos e invasão biológica por espécies exóticas. Portanto, é necessário conhecer a interação entre *Vibrio* spp. e mariscos, a fim de conhecer os riscos sobre a aquicultura.

Das 68 (sessenta e oito) cepas de *Vibrio* spp., 39,8% (27) e 60,2% (41) foram provenientes dos períodos estio e chuvoso, respectivamente. Dentre os v́brios, o maior número de cepas identificadas foi isolado das amostras de TM (22) e LI (17) das OC, seguido pelo TM (15) das OS.

Diante dos resultados, as amostras de TM da OC (12) e OS (9), apresentaram a maior diversidade de espécies de *Vibrio*, seguidos pelo LI das OC (7). No entanto, dentre as espécies identificadas, as que apresentaram maior frequência entre as amostras foram *V. ruber*, que só não foi encontrado nas amostras do LI das OS. Já *V. coralliilyticus* e *V. alginolyticus* foram encontrados nos TM e LI das ostras, e *V. littoralis* nas amostras de água e TM das ostras.

Analisando a frequência das espécies por amostra, foi detectada a maior frequência das espécies: *V. ruber* (29,4%) na água do entorno do cultivo; *V. ruber* (27,3%) e *V. coralliilyticus* (18,2%) no TM; *V. ruber* (29,4%) e *V. coralliilyticus* (29,4%) no LI das OC e de *V. ruber* (20%) e *V. navarrensis* (20%) no TM; *V. agarivorans* (50%) no LI das OS; e na água do entorno do banco natural não houve diferença na proporção entre as espécies.

Avaliando a tabela 7, pode-se verificar que o maior percentual de cepas de *Vibrio* identificadas foi durante o período chuvoso, com 60,3% (41) contra 39,7% (27), do período de estio. Contudo, a maior diversidade de espécies foi observada durante a estiagem, com 80% (16), e no período chuvoso, com 55% (11). Assim, como nas contagens de v́brios, não houve diferenças significativa entre as estações com relação à diversidade de espécies.

A temperatura da água é considerada um dos fatores mais importantes na distribuição e abundância de vibriões patogênicos (DALSGAARD, 1998). A densidade populacional desse grupo bacteriano em geral, permanece bastante baixa em temperaturas inferiores a 20 °C, enquanto que, em temperaturas entre 20 e 30 °C são registradas as maiores contagens. No entanto, esta sazonalidade é mais clara em regiões de clima temperado, onde as estações são bem definidas, e são registradas grandes variações de temperatura da água (IGBINOSA; OKOH, 2008).

Analisando a diversidade e distribuição dos isolados de *Vibrio* em ostras e ambiente é possível estabelecer que as espécies potencialmente patogênicas ao homem (*V.*

*alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. metschnikovii*, *V. mimicus* e *V. vulnificus*) foram isoladas durante a estiagem, onde a temperatura média da água foi de 29,8 °C contra 28,6 °C, durante a estação chuvosa. Esses vibrios recebem maior atenção, por já terem sido amplamente relacionados como agentes etiológicos, em casos de enfermidades como gastroenterites, otite, infecções cutâneas e infecção sistêmica com elevada taxa de mortalidade humana (IGBINOSA; OBI; OKOH, 2009; IGBINOSA; OKOH, 2008; MORRIS JR, 2003; MURRAY, 2004; PEREIRA; VIANA; RODRIGUES, 2007).

Assim, como já era esperado, algumas espécies de vibrios foram isoladas tanto do meio seletivo para *Vibrio* como no meio não seletivo para o gênero. Entre as populações de BHC Gram-negativas, as espécies comuns aos dois (2) meios foram: *V. alginolyticus*, *V. coralliilyticus*, *V. ichthyenteri*, *V. litoralis*, *V. metschnikovii*, *V. navarrensis* e *V. vulnificus*.

O isolamento de *V. alginolyticus* é bastante comum em ostras no Brasil (PEREIRA; VIANA; RODRIGUES, 2007; VIEIRA *et al.*, 2010b), nos Estados Unidos (PRAPAIWONG; WALLACE; ARIAS, 2009) e na China (CHEN *et al.*, 2011) e neste estudo, a espécie representou 8,8% (6) dos isolados de *Vibrio* spp.

*V. mimicus* foi detectado somente em amostra de TM das OS, durante a estiagem. Essa bactéria tem como *habitats* naturais, ecossistemas aquáticos formados por água salgada, salobra ou doce, podendo fazer parte da microbiota de zooplâncton, crustáceos e bivalves, mas sua relevância está associada à patogenicidade em seres humanos (VIEIRA, V. V. *et al.*, 2001). A preocupação de sua presença nos TM de OS é devido à grande similaridade dos fatores de virulências, entre *V. mimicus* e *V. cholerae* (HASAN *et al.*, 2010).

Conforme Vieira *et al.* (2009) *V. mimicus* pode ser encontrado tanto durante a estiagem, quanto na estação chuvosa. Rebouças *et al.* (2011) isolaram *V. mimicus* de amostras de camarão marinho (*L. vannamei*) e de água, em viveiros de três (3) fazendas de carcinicultura, na costa do Estado do Ceará, nos estuários dos rios Acaraú, Coreaú e inclusive no Jaguaribe. Entretanto na presente pesquisa ele somente foi identificado no TM de OS na estiagem.

Entre os vibrios isolados uma (1) cepa de *V. metschnikovii* também foi confirmada nos TM das OC, durante a estiagem. Cao *et al.* (2010) ressaltam o risco desta espécie em produtos alimentícios, pois *V. metschnikovii* é um micro-organismo infeccioso em animais, e pode ser transmitido através da cadeia alimentar.

Apesar de já terem sido relatados, no mundo, diversos casos de infecções humanas provenientes do biótipo B2 de *V. vulnificus*, ele também é importante patogênico para os organismos aquáticos (BISHARAT *et al.*, 2007). Neste trabalho também foi identificado o

biótipo 2. Cañigral *et al.* (2009) identificaram espécies de *V. vulnificus* em frutos do mar, em água marinha e em efluentes das áreas da costa do Mediterrâneo.

Segundo Ittoop *et al.* (2010), os moluscos constantemente são acometidos de doenças devido a infecções bacterianas, e o sucesso desse confronto é consequência da resposta do sistema de defesa. Quando esses animais encontram-se fisiologicamente fracos o ataque por patógenos é facilitado. Em experimento, os autores comprovaram que a *C. madrasensis*, anteriormente saudáveis, depois de infecção induzida por *V. alginolyticus*, podem recuperar-se quando mantidos em condições de cultivo adequadas.

Foi isolado *V. harveyi* apenas em água da estrutura de cultivo, durante a estiagem. A presença desta bactéria na água é um fator preocupante para a atividade de ostreicultura, haja visto que a mesma é reconhecida como patógeno de uma série de animais marinhos (AUSTIN; ZHANG, 2006), inclusive de ostra ostras. Tal fato foi comprovado em experimentos na França, onde 100% das cepas apresentaram-se virulentas em bioensaios, levando 20 horas após a infecção até a morte dos animais (SAULNIER *et al.*, 2010).

*V. pectenida* foi a quarta espécie mais frequente neste estudo. Foi isolada durante as estações chuvosa e de estiagem, tanto das OC quanto das OS, das amostras de água e TM. Apesar deste micro-organismo não oferecer dano à saúde humana, é importante patógeno responsável pela mortalidade de larvas de *Pecten maximus*, um bivalve de grande interesse econômico (SANDLUND *et al.*, 2006).

*V. campbellii* é uma espécie marinha de vida livre ou associada a organismos aquáticos (BULLER, 2004), e está descrito como uma das principais espécies causadoras de infecções nos camarões de cultivo (AGUIRRE-GÚZMAN; RUÍZ; ASCENCIO, 2004), sendo isolada de ostra do Pacífico (*C. gigas*) cultivada na costa da província de Fujian, China (SHEN *et al.*, 2005).

*Vibrio fortis* e *Vibrio tasmaniensis* foram as únicas espécies com reconhecido potencial patogênico para ostras isoladas no presente trabalho. Essas espécies são responsáveis por enfermidades em diversos bivalves. Em um bioensaio foi possível comprovar a patogenicidade do *V. tasmaniensis* em moluscos (LAGO; NIETO; SEGUÍN, 2009). *V. fortis* foi isolado de casos de mortalidade de *C. gigas* na França, porém seu papel patogênico não foi comprovado (SAULNIER *et al.*, 2010).

*V. tasmaniensis* foi descrito pela primeira vez, a partir de isolados de salmão (THOMPSON; THOMPSON; SWINGS, 2003), contudo, a presença em moluscos (ostras e amêijoas) foi relatada em outros estudos (GUISANDE *et al.*, 2008; LAGO; NIETO; SEGUÍN, 2009) mais recentes, feitos na Espanha. A preocupação com presença dessa espécie

bacteriana em ostras está relacionada ao fato da mesma poder atuar como patogênica em bivalves, o que foi comprovado por Lago, Nieto e Seguí (2009). No entanto, em outro estudo, um isolado dessa mesma espécie se mostrou avirulento em *C. gigas* (SAULNIER *et al.*, 2010).

*V. coralliilyticus* foi a segunda espécie mais isolada de *Vibrio* spp., em meio seletivo para o gênero. Foi elucidado pela primeira vez por Ben-Haim *et al.* (2003), em isolados de corais doentes (*Pocillopora damicornis*) do Oceano Índico, em larvas de ostras (*C. gigas*) doentes no Reino Unido e larvas de bivalves (*Nodipecten nodosus*) saudáveis no Brasil. Depois de sua descoberta, *V. coralliilyticus* já foi mencionado em diversos *habitats* (CARVALHO, 2009; MUNN; MARCHANT; MOODY, 2008; REMILY; RICHARDSON, 2006; VIEIRA *et al.*, 2010a), porém até o momento, não foi confirmado como patógeno para moluscos bivalves.

*V. ruber* foi a espécie de vibrio isolada em maior número (com 25% (17)) principalmente no período chuvoso. A espécie é conhecida por fazer parte de um clado, formado por víbrios não patogênicos e incapazes de produzirem bioluminescência (DIKOW, 2011). Foi caracterizado pela primeira vez em água do mar das regiões rasas do litoral de Keelung, Taiwan (SHIEH *et al.*, 2003). Também pode ser encontrado na rizosfera de diferentes plantas de mangue (*Porteresia coarctata*, *Avicennia marina* e *Rhizophora mucronata*), e é capaz de produzir pigmentos vermelhos (RAMESHKUMAR; NAIR, 2009). Sua presença na ostra não apresenta nenhum perigo ao animal ou mesmo ao homem.

Algumas espécies de *Vibrio* spp. como *V. agarivorans*, *V. calviensis*, *V. diabolicus*, *V. littoralis*, *V. natriegens*, *V. navarrensis* são habitantes naturais de ecossistemas aquáticos costeiros, e até o momento, não foram confirmadas suas patogenicidades (BULLER, 2004). Outra espécie, como é o caso de *V. superstes*, são comensais do intestino de abalones (*Haliotis laevigata* e *H. rubra*) (HAYASHI *et al.*, 2003). A presença destas bactérias em ambientes ou animais de aquicultura é relatada em estudos recentes (MENEZES, 2011; VIEIRA *et al.*, 2010a, 2010b).

Foi encontrada apenas, um único espécime de *V. fischeri*, nas amostras de água da estrutura de cultivo durante a estiagem. Assim como as espécies anteriores, apenas um isolado de *V. ichthyenteri* foi identificado durante a estação chuvosa, das amostras de água. Esses resultados estão de acordo com Menezes (2011), que também isolou essas duas (2) espécies, acima citadas, nos estuários do rio Jaguaribe e do rio Choró.

*V. fischeri* pode ser encontrado em águas do mar de diferentes áreas geográficas, emite bioluminescência, e vive em simbiose mutualística no órgão luminoso de alguns

animais marinhos (BOETTCHER; RUBI, 1990; RUBY *et al.*, 2005). Segundo Meujo *et al.* (2010), essa bactéria não apresenta patogenicidade. Esta espécie habita o intestino de copepodas, caranguejos, camarões, lulas e peixes, e produz quitinase, auxiliando na digestão desses animais (SUGITA; ITO, 2006).

A espécie *V. ichthyenteri* é originária do intestino de vários animais marinhos, e auxiliam na digestão da quitina, presente nas principais fontes de carbono (crustáceos, moluscos, celenterados, protozoários) disponíveis no ambiente marinho (SUGITA; ITO, 2006).

Segundo Pruzzo, Gallo e Canesi (2005) uma vez dentro dos tecidos, vibriões podem atingir concentrações perigosas para a saúde humana, quando ostras são consumidas *in natura* ou parcialmente cozidas. Os autores afirmam que a depuração é o método utilizado na tentativa de diminuir a níveis aceitáveis a carga microbiana em todo mundo, contudo a eficiência da depuração varia de acordo com o tempo de duração e da espécie.

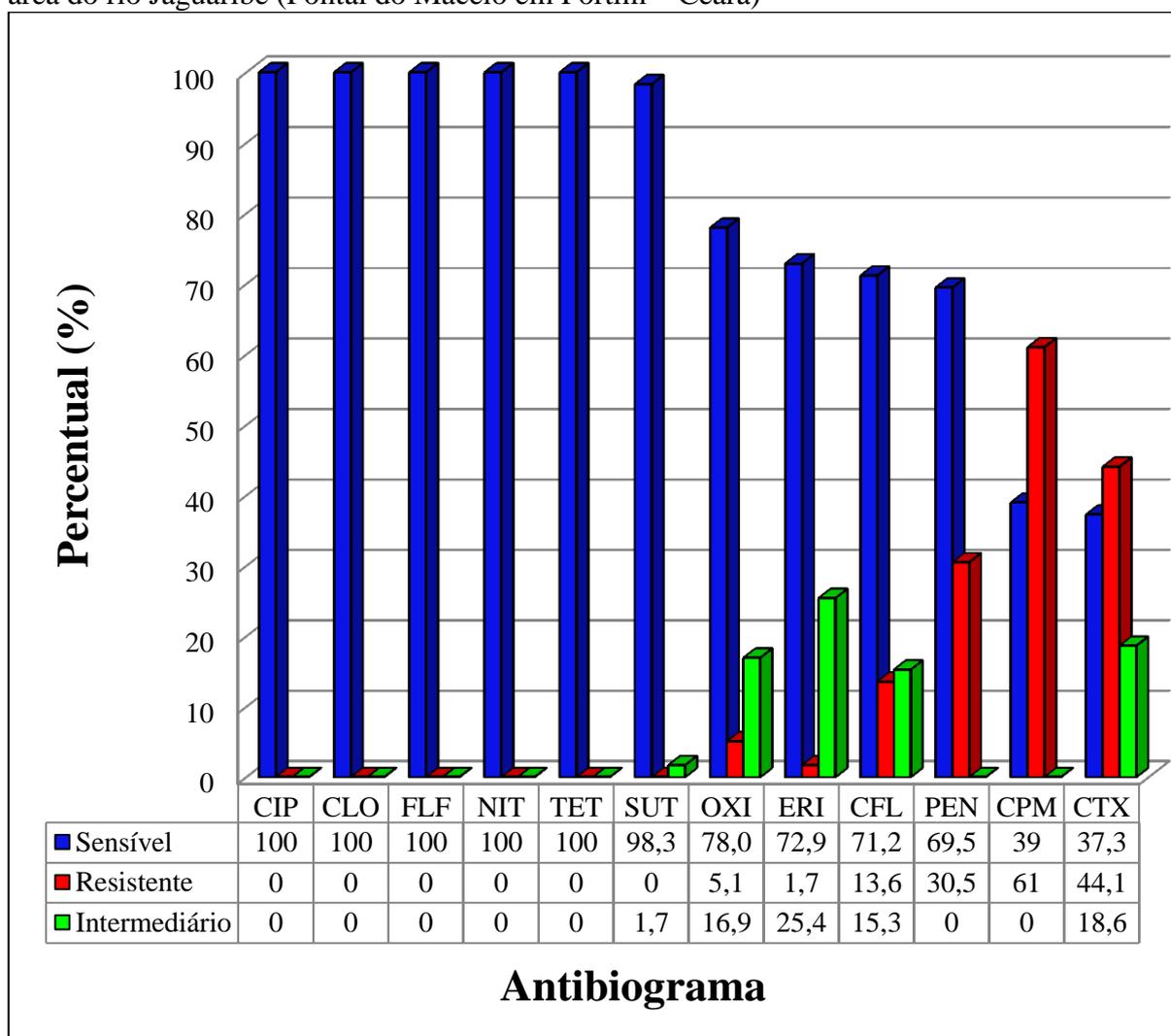
## **5.6 Perfis de suscetibilidade dos isolados frente a antimicrobianos**

No gráfico 1 encontram-se os percentuais de susceptibilidade das 59 (cinquenta e nove) cepas das linhagens de BHC Gram-positivas, frente a 12 (doze) antimicrobianos, pertencentes a oito (8) classes distintas. Das 59 (cinquenta e nove) cepas, 66,1% (39) foram resistentes a pelo menos um (1) antimicrobiano.

Dos 12 (dozes) antimicrobianos testados, 41,7% (5) apresentaram 100% de eficácia contra as 59 (cinquenta e nove) cepas Gram-positivas: CIP, CLO, FLF, NIT e TET. O percentual de sensibilidade das bactérias para SUT também foi elevado, 98,3% (58).

Os resultados obtidos corroboram com os de Parvathi *et al.* (2009), que mencionaram a ocorrência de susceptibilidade à amoxicilina, bacitracina, canamicina, ciprofloxacina, cloranfenicol, cotrimaxazole, eritromicina, gentamicina, tetraciclina e vancomicina, para 100% (16) das cepas de *Bacillus* spp., isolados de amostras de água do mar, sedimentos e frutos do mar coletados em Cochin Were, costa ocidental da Índia.

Gráfico 1 – Percentual de susceptibilidade a antimicrobianos entre linhagens de bactérias Gram-positivas isoladas das amostras de águas e ostras (líquido intervalvar e tecido) coletadas área do rio Jaguaribe (Pontal do Maceió em Fortim – Ceará)



CFL – cefalotina; CPM – cefepima; CTX – cefotaxima; CIP – ciprofloxacina; CLO – cloranfenicol; ERI – Eritromicina; FLF – florfenicol; NIT – nitrofurantoína; OTC – oxitetraciclina; PEN – penicilina G; SUT – sulfazotrim; TET – tetraciclina.

O perfil de resistência intermediária entre os isolados foi verificado para 41,7% (5) dos antimicrobianos testados, principalmente frente à eritromicina (26,7%). Na Itália, cepas de *L. monocytogenes* apresentaram perfil de resistência intermediária contra 31,6% (6) dos antimicrobianos testados: ciprofloxacina (1,6%), clindamicina (4,8%), eritromicina (2,4%), moxifloxacina (69,7%), quinupristina/dalfopristina (0,8%) e tetraciclina (0,8%) (CONTER *et al.*, 2009). Sharma e Thapaliya (2009) relatam resistência intermediária à eritromicina (16,7%) e penicilina G (16,7%), por cepas de *Bacillus* spp. e *Corynebacterium* spp., sendo que o gênero *Bacillus* e *Corynebacterium* também apresentaram esse perfil frente ao cloranfenicol (16,7%) e cotrimoxazol (16,7%), respectivamente. A resistência intermediária

em uma população bacteriana significa a diminuição da eficiência dos antimicrobianos sobre a microbiota alvo, necessitando de concentrações maiores desses fármacos para combater as infecções.

O perfil de resistência foi observado frente a 50% (6) dos antimicrobianos testados. Individualmente, os percentuais mais altos foram contra cefepima (60%), cefotaxima (43,3%) e penicilina G (31,7%). Corroborando com os resultados, Sharma e Thapaliya (2009) mencionam resistência  $\geq 20\%$  à cotrimoxazol (20%), estreptomicina (20%), penicilina G (73,3%), tetraciclina (20%) e vancomicina (20%), em bactérias Gram-positivas. Segundo os autores, esses altos percentuais de resistências frente aos fármacos testados, ocorreram principalmente pela contaminação em corpos d'água por antimicrobianos e metais pesados, haja visto que, muitos dos genes de resistências a ambos os elementos químicos, estão codificados na mesma estrutura genética móvel.

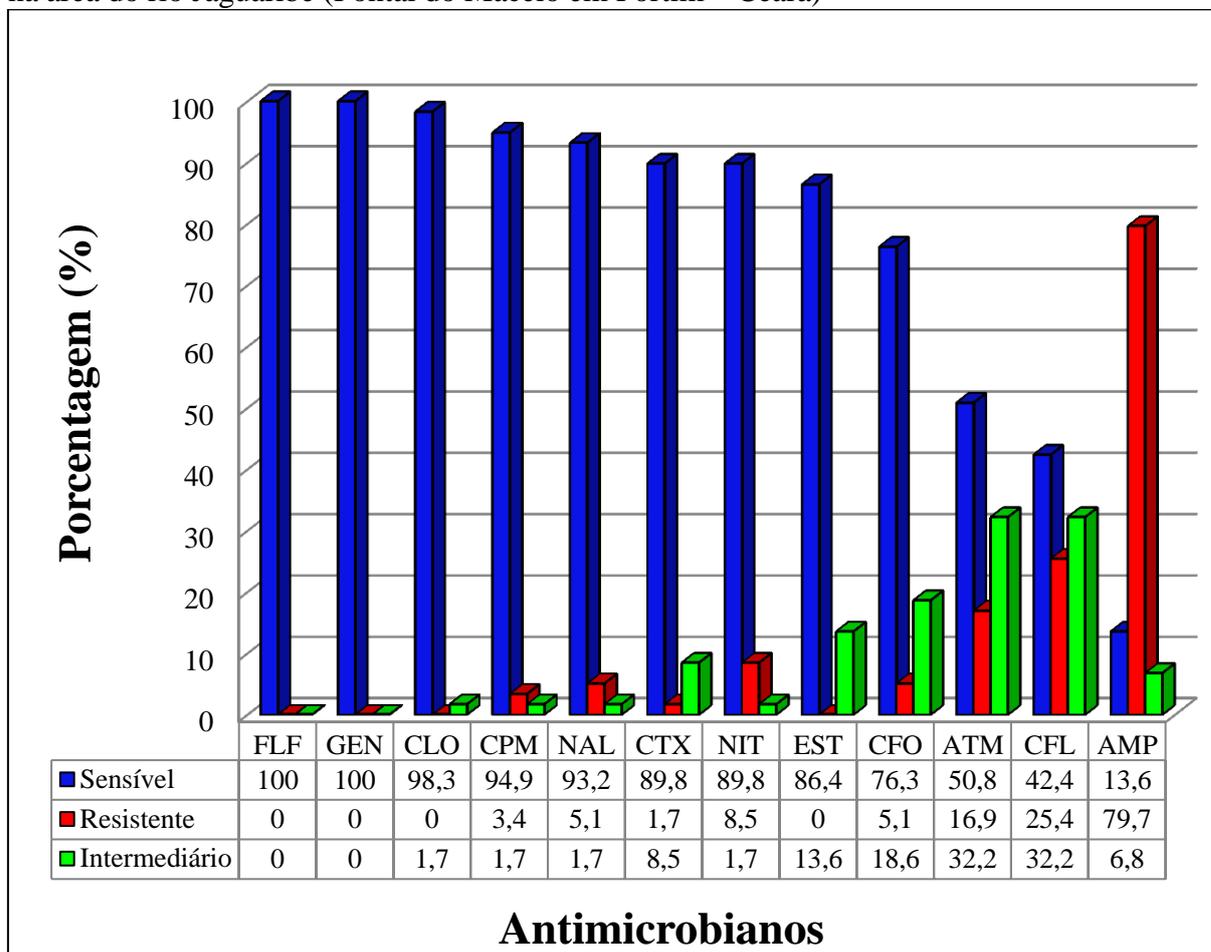
Diferentemente dos resultados descritos, Dang *et al.* (2008) detectaram BHC Gram-positivas resistentes à CLO, isoladas de amostras de água da baía de Jiaozhou, na China, mesmo cinco (5) anos depois das autoridades chinesas terem proibido o uso de CLO. Além disto, também foram confirmados genes (*cat I*) inseridos nos plasmídios, que codificam a resistência ao CLO, em cepas de *Bacillus* spp. Do mesmo modo, Gao *et al.* (2012) observaram em bactérias heterotróficas isoladas em águas influenciadas pela aquicultura em Tianjin, norte da China, resistência à tetraciclina e sulfametoxazol. Os autores ainda citam *Bacillus* spp., como as principais bactérias que apresentaram resistência à tetraciclina (57,1%) e sulfametoxazol (63,3%), dentro da população das BHC resistentes.

No gráfico 2 estão mostrados os percentuais de susceptibilidade e resistência, das 59 (cinquenta e nove) cepas das linhagens de BHC Gram-negativas, frente a 12 (doze) antimicrobianos pertencentes a sete (7) classes distintas. Das 59 (cinquenta e nove) cepas, 91,5% (54) foram resistentes a pelo menos um (1) antimicrobiano.

Apenas as substâncias FLF e GEN foram 100% eficazes contra todas as cepas testadas, e dos 12 (doze) antimicrobianos, oito (8) apresentaram um percentual de sensibilidade superior a 80%, que foram: FLF (100%); GEN (100%); CLO (98,3%); CPM (94,9%); NAL (93,2); CTX (89,8%) NIT (89,8) e EST (86,4%).

As cepas das BHC Gram-negativas apresentaram resistência intermediária contra 83,3% (10) dos antimicrobianos testados. ATM e CFL foram os fármacos aos quais, as cepas mostraram mais frequentemente esse comportamento (>20%).

Gráfico 2 – Percentual de susceptibilidade a antimicrobianos entre linhagens de bactérias Gram-negativas isoladas de amostras de águas e ostras (líquido intervalvar e tecido) coletadas na área do rio Jaguaribe (Pontal do Maceió em Fortim – Ceará)



NAL – ácido nalidíxico; AMP – ampicilina; ATM – aztreonam; CFL – cefalotina; CPM – cefepima; CTX – cefotaxima; CFO – cefoxitina; CLO – cloranfenicol; EST – estreptomicina; FLF – florfenicol; GEN – gentamicina; NIT – nitrofurantóina.

Os resultados estão de acordo com os relatados por Rojas *et al.* (2011), que descrevem características de resistência intermediária em cepas de *V. parahaemolyticus*, isolados de ostras e mexilhões, frente a cefotaxima (10,5%), ciprofloxacina (5,3%), cotrimoxazole (5,3%), estreptomicina (100%), gentamicina (10,5%) e tetraciclina (10,5%). No Brasil, cepas de *V. parahaemolyticus* isoladas de camarão (*Litopenaeus vannamei*), no Estado do Rio Grande do Norte, apresentaram resistência intermediária a 71,4% (5) dos antimicrobianos, com percentuais de 10% (sulfametoxazol-trimetoprima), 20% (amicacina), 30% (nitrofurantóina), 40% (tetraciclina) e 90% (ciprofloxacina) (MELO *et al.*, 2011).

Das 59 (cinquenta e nove) cepas, 79,7% (47) e 25,4% (15) foram resistentes a AMP e CFL, respectivamente. Frente aos antimicrobianos CLO e EST foram detectadas apenas resistências intermediárias.

Cepas bacterianas Gram-negativas, provenientes de ambientes aquícolas, na Austrália, também apresentaram perfis de resistência aos antimicrobianos AMP, CFL, NAL, FLF, CLO e GEN com percentuais elevados para ampicilina (56%) e cefalosporina (23%). A alta incidência de cepas resistentes, segundo os autores, provavelmente é decorrente do uso ilegal de antimicrobianos, visto que na Austrália não é legalizado o uso dessas drogas na prática da aquicultura (AKINBOWALE; PENG; BARTON, 2006).

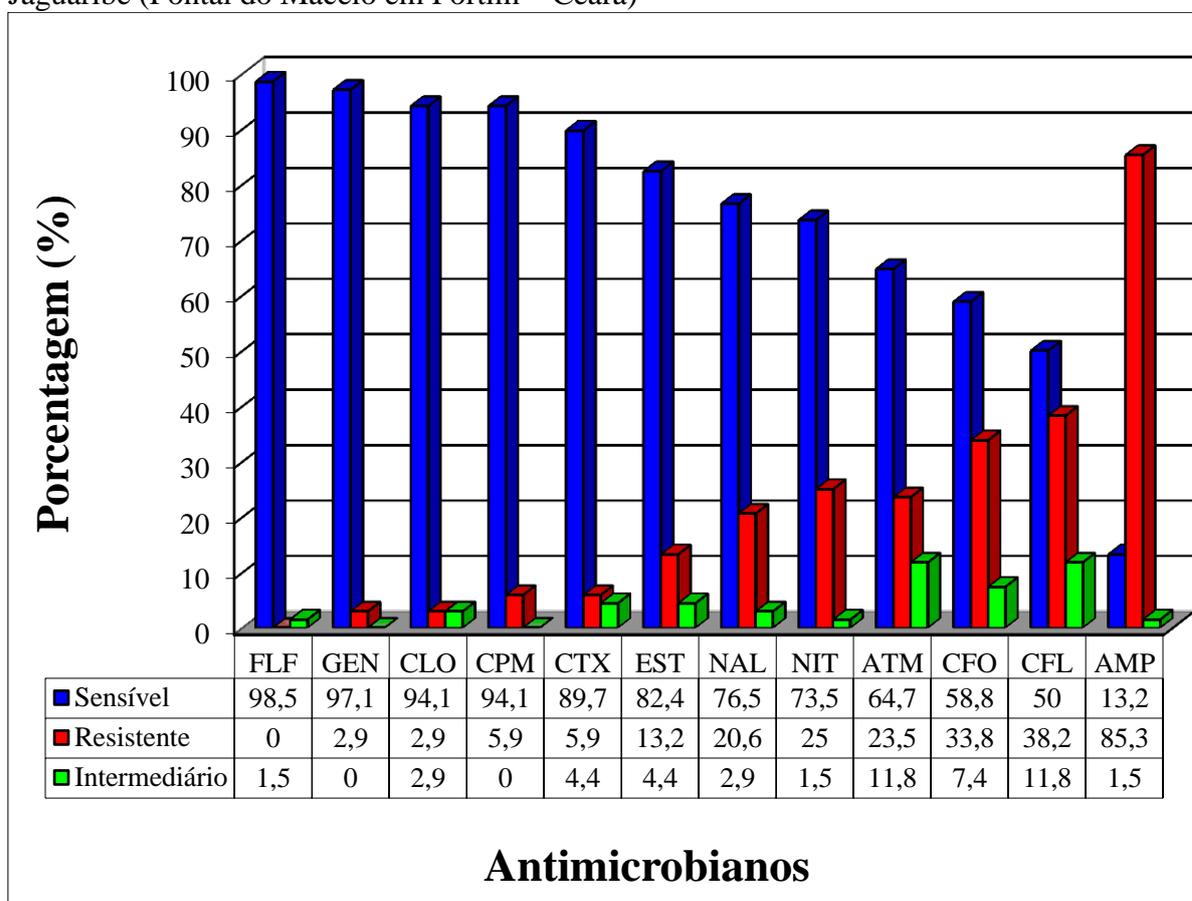
Corroborando com o presente estudo, Ghosh e Mandal (2010) detectaram altos percentuais de resistências a antimicrobianos como ácido nalidíxico (39,8%), ampicilina (79,6%), canamicina (30,1%), cloranfenicol (17,2%), colistina metano sulfonato (67,8%), estreptomicina (66,7%), nitrofurantoína (62,4%) e tetraciclina (43%), em bactérias heterotróficas Gram-negativas isoladas de peixes pelágicos na costa da Baía de Bengala, Índia.

Estirpes de *Aeromonas* isolados de peixes, no Iran, demonstraram alta resistência à tetraciclina (83,3%), penicilina G (62,5%), gentamicina (62,5%), norfloxacina (58,3%), azitromicina (50%), sulfametoxazol-trimetoprima (41,6%) e ácido nalidíxico (37,5%) (ANSARI; RAHIMI; RAISSY, 2011).

Os percentuais de susceptibilidade das 68 (sessenta e oito) cepas de *Vibrio* isoladas a partir do meio TCBS, aos 12 (doze) antimicrobianos, pertencentes a sete (7) classes diferentes, encontra-se no gráfico 3.

Dos 12 (doze) antimicrobianos testados, seis (6) apresentaram um percentual acima de 80% de eficácia: FLF (98,5%); GEN (97,1%); CLO (94,1%); CPM (94,1%); CTX (89,7%) e EST (82,4%). Estes resultados foram semelhantes aos do grupo maior de bactérias Gram-negativas. Estudos anteriores, também relataram percentuais de susceptibilidade em cepas de *Vibrio* spp., isoladas de ambientes de aquicultura e frutos do mar, superiores a 80% frente a: FLF, GEN e CLO, no Brasil (COSTA *et al.*, 2006; REBOUÇAS *et al.*, 2011), CLO, FLF e GEN, na Austrália (AKINBOWALE; PENG; BARTON, 2006), CTX e CLO na Itália (FERRINI *et al.*, 2008; OTTAVIANI *et al.*, 2001), CLO e EST, na Tailândia (KITIYODOM *et al.*, 2010), CPM, CTX e GEN, na China (LAI, Z.-F. *et al.*, 2009) e à CPM, na Turquia (MATYAR; KAYA; DINÇER, 2008).

Gráfico 3 – Percentual de susceptibilidade a antimicrobianos entre cepas de *Vibrio* spp. isoladas das amostras de águas e ostras (líquido intervalvar e tecido) coletadas área do rio Jaguaribe (Pontal do Maceió em Fortim – Ceará)



NAL – ácido nalidíxico; AMP – ampicilina; ATM – aztreonam; CFL – cefalotina; CPM – cefepima; CTX – cefotaxima; CFO – cefoxitina; CLO – cloranfenicol; EST – estreptomicina; FLF – florfenicol; GEN – gentamicina; NIT – nitrofurantoína.

Com exceção dos antimicrobianos GEN e CPM, as estirpes do gênero *Vibrio* spp. apresentaram perfis intermediários quando expostas aos demais antimicrobianos. ATM e CFL foram os fármacos aos quais os víbrios apresentaram maiores percentuais de resistência intermediária correspondendo a 11,8% (8). Esse padrão está coerente com o que foi verificado para o grupo maior de bactérias Gram-negativas, incluindo víbrios, onde percentuais de resistência intermediária acima de 30% foram verificados entre os isolados bacterianos. Colaborando com a pesquisa, Kim, J. H. *et al.* (2011) relataram resistência intermediária a todos os 22 (vinte e dois) antimicrobianos testados. Entre as 31 (trinta e uma) cepas de *V. vulnificus*, isoladas de moluscos e águas estuarinas para os antimicrobianos similares aos do presente estudo, os percentuais de resistência intermediárias foram de 9,8% (AMP), 12,9% (GEN), 16,1% (CLO), 22,6% (CPM), 25,8% (CFO), 32,2% (CFL) e 32,2% (CTX).

Ferrini *et al.* (2008) detectaram em 92 (noventa e duas) cepas de *Vibrio* spp., isoladas a partir de fontes diferentes (produtos da pesca nacionais e importados, marisco, água do mar de aquicultura, etc.) na Itália, resistência intermediária quando expostas à ampicilina (8,7%), cloranfenicol (1,1%) e à sulfametoxazol (7,6%). No Brasil, Rebouças *et al.* (2011) relataram resistência intermediária à ampicilina, aztreonam, cefoxitina e gentamicina, em *Vibrio* spp., isolados de ambientes de carcinicultura, localizados nos estuários dos rios Acaraú, Coreaú e Jaguaribe, no Estado do Ceará.

Do total de isolados bacterianos testados, mais de 20% apresentaram resistência frente à AMP, CFL, CFO, ATM, NIT e NAL. Apenas quando expostos ao FLF é que não foi observado marco de resistência, sendo que 1,5% dos isolados mostraram resistência intermediária.

Mejdi *et al.* (2010) obtiveram percentuais de resistência de cepas de *Vibrio* spp., isoladas de bivalves (*Mytilus edulis* e *C. gigas*) e água da lagoa de Bizerte, na Tunísia, de 97%, 66,7%, 33,3%, 33,3%, 6,1% e 6,1% para os antimicrobianos: AMP, GEN, NAL, NIT, CLO, CTX, respectivamente. Esses resultados são similares aos descritos neste trabalho, com exceção de GEN (2,9%), cujo percentual de resistência a este fármaco no presente trabalho foi muito abaixo do obtido pelos autores.

Índices elevados de resistência e de resistência intermediária também foram expressos por cepas de *Vibrio* spp., oriundas de pescados congelado e frescos (mexilhões, chocos, camarões e peixes), na Itália, com 91,5%, 67,6%, 60,6%, 14,1%, 4,2%, 0%, de resistência a EST, AMP, CFO, NIT, NAL, CTX, e com 7%, 5,6%, 16,9%, 21,1%, 14,1%, 12,7%, de resistência intermediária, respectivamente (OTTAVIANI *et al.*, 2001).

Taxa elevada de resistência a AMP também foi relatada por Han *et al.* (2007), em cepas de *V. parahaemolyticus* provenientes de ostras do Golfo de Louisiana, Estados Unidos, onde 81% (136) das estirpes foram resistentes ao antimicrobiano. No México, Roque *et al.* (2001) também observaram alta resistência de *Vibrio* spp. frente a AMP, em 68% das cepas. Na Índia, Chakraborty, Surendran e Chakraborty (2009) mencionam resistência a AMP, em 100% das cepas de *V. parahaemolyticus*, isolados de ambientes de carcinicultura na cidade portuária de Cochin.

Na Coreia, cepas de *V. parahaemolyticus* provenientes de frutos do mar (moluscos, camarões e pepino do mar), águas costeiras e de casos de infecções clínicas, foram 100% resistentes quando expostas à AMP (JUN *et al.*, 2012). Comparando os demais antimicrobianos (CFL, CFO, CLO, CPM, CTX e GEN), os percentuais de resistência

detectados pelos autores foram muito superiores aos desse estudo, sendo de duas (2) a 20 (vinte) vezes maiores.

Na Nigéria, pescados (camarões, caranguejos e moluscos) apresentaram populações de *Vibrio* spp. com altos percentuais de resistências à amoxicilina (100%), augmentin (100%), cloranfenicol (100%), nitrofurantoína (100%), gentamicina (95%), tetraciclina (93%), cotrimoxazol (64%) e ofloxacina (50%) (ADELEYE *et al.*, 2008), muito superiores comparados aos da presente pesquisa. Conforme os mesmos autores, o elevado perfil de resistência apresentado pelas cepas foi atribuído ao uso sem controle de antimicrobianos, na região da cidade de Lagos, principalmente de ampicilina, cloranfenicol e tetraciclina.

Kitiyodom *et al.* (2010) detectaram em 83 (oitenta e três) isolados de *Vibrio* spp., de camarões cultivados na Tailândia, taxas de resistência à ampicilina, eritromicina, sulfametoxazol, ciprofloxacina, trimetoprima, tetraciclina, enrofloxacina e estreptomicina de 61%, 42%, 28%, 20%, 20%, 19%, 14% e 7%, respectivamente. Todos os isolados foram sensíveis ao cloranfenicol e a canamicina. Esses dados foram semelhantes aos observados no presente trabalho. De acordo com os mesmos pesquisadores, o uso de antimicrobianos na aquicultura cria uma pressão sobre a microbiota aquática, selecionando micro-organismos resistentes, além de promover a transferência lateral de genes de resistência, entre *Vibrio* spp. e outras bactérias aquáticas.

Comparando os dados com isolados clínicos de *Vibrio* spp., Rodrigues *et al.* (2001) obtiveram, respectivamente, percentuais de sensibilidade de 100%, 100% e 84% ao CLO, NAL e NIT, respectivamente. Nos isolados ambientais do presente estudo, os percentuais de sensibilidade dos isolados frente às mesmas substâncias foram de 97,1%, 79,4% e 75%. O confronto entre estes resultados serve como um alerta para a redução da eficácia dos fármacos em bactérias de origem ambiental.

A alta resistência de cepas de *Vibrio* spp. à AMP, verificada no presente estudo, concordam com resultados documentados na Índia, tanto de *Vibrio* spp. isolados de corais saudáveis e mortos na ilha Kurusadai (HALDAR; MODY; JHA, 2011), como de cepas de *V. cholerae*, provenientes de água de diferentes esgotos, lagoas e rios (FAKRUDDIN *et al.*, 2011), ambas com elevados índices de resistência, 100% e 94,4%, respectivamente. As duas pesquisas concordam que substâncias antibacterianas presentes em ecossistemas aquáticos promoveram a seleção de bactérias resistentes.

No Iran, cepas de *Vibrio* spp. isoladas de lagostas (*Panulirus homarus*) apresentaram índices de resistência de 92,3% quando expostas à AMP, e para EST foi de

85,7% (ANSARI; RAISSY, 2010). O percentual de resistência ao último foi muito superior ao encontrado no presente estudo. Segundo os mesmos autores, a alta incidência de resistência a essas drogas pela microbiota de animais aquáticos, sem histórico de uso recente de antimicrobianos no cultivo, está relacionado a uma maior utilização no tratamento profilático na carcinicultura.

Traçando os perfis de susceptibilidade a antimicrobianos entre isolados bacterianos em fazendas de camarão com diferentes formas de cultivo nas Filipinas, Tendência e La Penã (2001) verificaram uma relação, entre o uso de substâncias antimicrobianas no cultivo e maiores percentuais de cepas resistentes entre os isolados. No mesmo estudo, foram verificados perfis de resistência significativamente menores entre os isolados da fazenda, que não utilizavam antimicrobianos (19%) há mais de cinco anos. Segundo os autores, a resistência múltipla ou intermediária é consequência do uso de antimicrobianos nas atividades aquícolas.

O aumento da resistência aos antimicrobianos ao longo do tempo, em cepas de *V. parahaemolyticus*, isolados de moluscos bivalves, na Espanha, foi diagnosticada por Roque *et al.* (2009). Esses autores obtiveram resultados, que indicaram o decréscimo significativo ( $p \leq 0,05$ ,  $n = 36$ ) da susceptibilidade, entre 2006 e 2008, a 72,2% dos seguintes antimicrobianos testados: amoxicilina, ampicilina, ceftazidima, ciprofloxacina, doxiciclina, flumequina, gentamicina, neomicina, nitrofurantoína, polimixina B, sulfametoxazol-trimetoprima, tetraciclina e vancomicina.

Manivasagan *et al.* (2010) em estudo realizado em Muthupettai região de manguezal na costa sudeste da Índia, relatam que a maioria dos *Vibrio* spp. resistentes foi encontrado na área de descarga de carcinicultura, e as mais sensíveis a partir do mar aberto. Concordando com a pesquisa, Holmström *et al.* (2003), McEwen e Fedorka-Cray (2002) mencionam, que à priori, os antimicrobianos eram empregados no combate a infecções humanas, e que com o passar do tempo foram usadas de forma descontrolada na produção animal e agrícola, e essa é a provável causa para o surgimento de patógenos resistentes.

Essas informações indicam a pressão exercida pelas atividades antrópicas sobre a microbiota, resultando em seleção de populações de *Vibrio* spp. resistentes a antimicrobianos. A comunidade científica adverte que a resistência antimicrobiana é consequência das pressões sofridas pelas populações microbianas, frente ao uso indiscriminado de antimicrobianos em diversas atividades (tratamento de esgotos, agricultura, pecuária, aquíicultura) com fins terapêuticos, profiláticos e até mesmo, como promotores de crescimento (BAQUERO; MARTÍNEZ; CANTÓN, 2008; MCEWEN; FEDORKA-CRAY, 2002). Em 2000, a OMS

(Organização Mundial de Saúde) declarou que a resistência aos antimicrobianos representava um grande risco a saúde humana, visto que o problema era crescente em todo mundo (WHO, 2000).

A resistência bacteriana pode ocorrer, principalmente, pela pressão seletiva sofrida no meio ambiente, decorrente da presença de agentes antimicrobianos (RODGERS; FURONES, 2009), ou por variação genética, que ocorre em consequência de eventos recombinatórios, que pode ser por fatores multacionais ou por trocas genéticas entre microorganismos, ou seja, pela permuta de elementos móveis (plasmídios, transposons e integrons), que ocorre entre bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes (ALTERTHUM, 2008a; BAQUERO; MARTÍNEZ; CANTÓN, 2008; KITTYODOM *et al.*, 2010).

Entre as atividades que fazem uso de antimicrobianos, a aquicultura ganhou destaque na União Europeia, quando detectou níveis inaceitáveis de cloranfenicol em camarões provenientes da região sudeste da Ásia (RODGERS; FURONES, 2009), visto que, esta droga promove anemia aplástica em seres humanos (JOHNSTON; SANTILLO, 2002).

Nos Estados Unidos é proibido o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento na aquicultura, mas alguns (sulfadimetoxina-ormetoprim e oxitetraciclina) são liberados para o tratamento de infecções bacterianas em peixes (MCEWEN; FEDORKA-CRAY, 2002).

No Brasil, a partir de 2003 as regras de utilização de antimicrobianos na aquicultura começaram a mudar por conta da forte pressão sofrida do governo brasileiro pela União Europeia. O MAPA através da Instrução Normativa nº. 9 de 2003, proibiu a utilização de cloranfenicol e nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e na alimentação de todos os animais e insetos (BRASIL, 2003). Em 2009, o MAPA proibiu os anfenicóis, tetraciclina,  $\beta$ -lactâmicos (benzilpenicilâmicos e cefalosporinas), quinolonas e sulfonamidas sistêmicas, na utilização como aditivos zootécnicos melhoradores de desempenho ou como conservantes de alimentos para animais (BRASIL, 2009).

Doenças infecciosas geram uma grande preocupação na aquicultura, tanto em termos de potenciais impactos negativos sobre a produção como em impactos da doença sobre as populações selvagens. Surtos de doenças são normalmente causados por patógenos oportunistas amplamente distribuídos. Em sistemas naturais, eles têm uma baixa prevalência e baixa intensidade de infecção (JOHNSTON; SANTILLO, 2002).

É sabido, que os antimicrobianos são utilizados na carcinicultura para prevenir ou tratar os surtos de doenças, mas há pouca documentação publicada em detalhes sobre os

padrões de uso (HOLMSTRÖM *et al.*, 2003). Para se avaliar esse risco eminente, os autores fizeram uma pesquisa na Tailândia, onde detectaram que 73,7% (56) dos fazendeiros utilizavam antimicrobianos e a lista incluía pelo menos treze (13) diferentes tipos, sendo que 85,7% (48) dos proprietários faziam uso profilático desses medicamentos.

Conforme Baquero, Martínez, Cantón (2008), Martínez e Cantón (2008), uma parte importante da dispersão e evolução de bactérias resistentes aos antimicrobianos depende da água. Em ecossistemas aquáticos, as bactérias de diferentes origens (animal, humana, ambiental) são capazes de se misturar, e desenvolver mecanismos de resistência em consequência das trocas promíscuas de elementos genéticos móveis ou da recombinação de genes. Conjuntamente, antimicrobianos, desinfetantes e metais pesados são liberados na água e podem exercer atividades seletivas, bem como danos ecológicos em comunidades aquáticas, resultando em resistência aos agentes antimicrobianos (MATYAR *et al.*, 2010; SHARMA; THAPALIYA, 2009).

O uso de antimicrobianos na aquicultura, além de promover a resistência entre os patógenos de animais cultivados e seres humanos (BRASIL, 1999; HOLMSTRÖM *et al.*, 2003), podem ter outro efeito negativo sobre outros organismos aquáticos (BAQUERO; MARTÍNEZ; CANTÓN, 2008). A existência de antimicrobianos em ecossistemas aquáticos podem apresentar efeitos tóxicos em microalgas utilizadas na alimentação de cultura larval de moluscos, peixes e crustáceos (CAMPA-CÓRDOVA *et al.*, 2006; LAI, H.-T. *et al.*, 2009), como também podem afetar as plantas na replicação, transcrição e tradução de cloroplastos (BRAIN *et al.*, 2008), além da bioacumulação em ecossistemas aquáticos, que potencializa os efeitos negativos (HOLMSTRÖM *et al.*, 2003).

Outra grande preocupação é o efeito dos antimicrobianos sobre as cianobactérias, em grande parte susceptíveis aos agentes, visto que representam mais de 70% da biomassa fitoplanctônica, e são responsáveis por mais de um terço da produção total de O<sub>2</sub> livre e da fixação de CO<sub>2</sub> (BAQUERO; MARTÍNEZ; CANTÓN, 2008; BRASIL, 1999).

Os perfis de resistência aos 12 (doze) antimicrobianos apresentados pelos isolados bacterianos Gram-positivos estão mostrados na tabela 8. Entre esses isolados, 66,1% (39) foram resistentes a, pelo menos, um (1) antimicrobiano. Os isolados sensíveis a todos os antimicrobianos foram os isolados dos gêneros *Oerskovia* e *Staphylococcus*.

Tabela 8 – Perfis de resistência entre cepas bacterianas Gram-positivas, isoladas das amostras de águas e ostras (líquido intervalar e tecido), coletadas na área do rio Jaguaribe (Pontal do Maceió em Fortim – Ceará)

| Identificação               | N         | Número de cepas com perfil de resistência por antimicrobiano testado |          |          |           |           |           |          |          |           |          |          |           |
|-----------------------------|-----------|--|----------|----------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|-----------|----------|----------|-----------|
|                             |           | CFL  | CIP      | CLO      | CPM       | CTX       | ERI       | FLF      | NIT      | PEN       | SUT      | TET      | OTC       |
| <i>Bacillus</i> spp.        | 29        | 17   |          |          | 18        | 18        | 14        |          |          | 18        |          |          | 11        |
| <i>Corynebacterium</i> spp. | 15        |  |          |          | 13        | 14        |           |          |          |           | 1        |          | 1         |
| <i>Kurthia</i> spp.         | 2         |  |          |          | 1         | 1         | 1         |          |          |           |          |          | 1         |
| <i>Listeria</i> spp.        | 4         |  |          |          | 3         | 3         | 1         |          |          |           |          |          |           |
| <i>Oerskovia</i> sp.        | 1         |  |          |          |           |           |           |          |          |           |          |          |           |
| <i>Staphylococcus</i> spp.  | 6         |  |          |          |           |           |           |          |          |           |          |          |           |
| CNI                         | 2         |  |          |          | 1         | 1         |           |          |          |           |          |          |           |
| <b>Total</b>                | <b>59</b> | <b>17</b>  | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>36</b> | <b>37</b> | <b>16</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>18</b> | <b>1</b> | <b>0</b> | <b>13</b> |

N: número de cepas; CNI: cepas não identificadas; CFL: cefalotina; CPM: cefepima; CTX: cefotaxima; CIP: ciprofloxacina; CLO: cloranfenicol; ERI: Eritromicina; FLF: florfenicol; NIT: nitrofurantoína; OTC: oxitetraciclina; PEN: penicilina G; SUT: sulfazotrim; TET: tetraciclina.

No Brasil, Interaminense *et al.* (2010) detectaram susceptibilidade aos antimicrobianos em 100% das cepas de *Staphylococcus* spp., isoladas das espécies de tubarões *Carcharhinus leucas* (cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, levofloxacina, rifampicina, tetraciclina e vancomicina) e *Galeocerdo cuvier* (clindamicina, levofloxacina e tetraciclina) em Recife, Estado de Pernambuco. Diferentemente desses resultados, Harnisz, Gołaś e Pietruk (2011) relataram resistência pelo menos a quatro (4) antimicrobianos (amoxicilina, ampicilina, enrofloxacin e tetraciclina), por cepas de *Staphylococcus* spp., isoladas de amostras de água, na Polônia, influenciada pela atividade de piscicultura. Na Austrália, cepas de *Staphylococcus* spp. provenientes de ambientes aquícolas, se mostraram resistentes a ácido nalidíxico, ácido oxolínico, ampicilina, canamicina, cefalexina, eritromicina, florfenicol, oxitetraciclina, tetraciclina e trimetoprima (AKINBOWALE; PENG; BARTON, 2006).

Isolados do gênero *Bacillus* foram os que tiveram maior representatividade e apresentaram percentuais elevados de resistência, 62,1% (18) para PEN, CPM e CTX, e 58,6% (17) à CFL. Os representantes do gênero *Corynebacterium* também apresentaram percentuais de resistência elevados à CTX (93,3%) e CPM (86,7%).

No Nepal, cepas de *Bacillus* spp. e *Corynebacterium* spp. resistentes a metais pesados, isoladas de efluentes de indústria têxtil, apresentaram percentuais elevados de resistência aos antimicrobianos CLO, ERI, PEN e TET (SHARMA; THAPALIYA, 2009). Nesta pesquisa os autores relacionam a possível associação entre a tolerância de metais pesados e resistência aos antimicrobianos. De acordo com Matyar *et al.* (2010), realmente bactérias resistentes a metais pesados se mostraram mais resistente a antimicrobianos.

Entre os isolados de *Listeria* spp., foi constatada resistência apenas a CPM, CTX e ERI. Conter *et al.* (2009) detectaram susceptibilidade elevada entre 120 (cento e vinte) estirpes de *L. monocytogenes*, isoladas de alimentos (pescados e carnes) e ambientes de processamento de alimentos, na Itália.

Yan *et al.* (2010) citaram CTX, CIP e TET, como os antimicrobianos aos quais cepas de *L. monocytogenes* isoladas de alimentos (pescados, carnes, vegetais e outros) apresentaram os maiores índices de resistência. No entanto, foi registrada susceptibilidade em mais de 90% dos isolados à ampicilina, ampicilina-sulbactam, cefalotina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, imipenem, levofloxacina, moxifloxacina, penicilina G, rifampina, sulfametoxazol-trimetoprima e vancomicina.

Nas bactérias Gram-positivas, o maior percentual de resistência entre as cefalosporinas foram detectados na seguinte ordem crescente: CFL (1ª geração); CPM (4ª

geração) e CTX (3ª geração). A explicação para tal situação poderia as alterações químicas feitas na molécula ativa dessas substâncias que passaram a ter ação tanto sobre as células bacterianas Gram-positivas como as Gram-negativas (TRABULSI; MIMICA; MIMICA, 2008). Contudo, conforme Davies e Davies (2010) há evidências de uma possível direção favorável para a transferência de genes de resistência, entre bactérias Gram-positivas para Gram-negativas, no entanto, o inverso não é recíproco. Isso explicaria o fato das Gram-negativas apresentarem maior percentual de resistência a cefalotina do que as Gram-positivas.

Na tabela 9, encontram-se a identificação até espécies e os perfis de resistência frente aos 12 (doze) antimicrobianos testados, apresentados pelas cepas bacterianas Gram-negativas isoladas de meio seletivo para bactérias heterotróficas.

Quanto às linhagens Gram-negativas das BHC, apenas 8,5% (5) das cepas foi sensível a todos os antimicrobianos testados, esse grupo foi composto pelas espécies *Moraxella lacunata*, *V. littoralis*, *V. metschnikovii* e por duas (2) cepas não identificadas. A maior incidência de resistência foi entre os gêneros *Aeromonas* spp. e de *Vibrio* spp., fato justificado pelo maior número de cepas.

Todas as *Aeromonas* spp. foram resistentes à AMP, e 85% (17) delas foi resistente à CFL, o gênero apresentou resistência à sete (58,3%) dos antimicrobianos avaliados.

As espécies de *Vibrio* apresentaram perfil de resistência à nove (75%) dos antimicrobianos testados. O maior percentual de resistência foi observado para AMP, CFL e ATM, com 75% (12), 68,7% (11), 56,2% (9), respectivamente.

Resultados similares aos expostos acima, foram publicados por Dumontet *et al.* (2000), cujos percentuais de resistência à AMP e CFL foram os maiores entre os antimicrobianos testados contra as bactérias dos gêneros *Aeromonas* e *Vibrio* isoladas de moluscos e águas costeiras na Itália. Silva (2009) menciona *Aeromonas* spp., isoladas do estuário do rio Cocó (Estado do Ceará), com elevados percentuais de resistência à AMP (80,5%) e CFL (68,3%).

Tabela 9 – Perfis de resistência entre cepas Gram-negativas das bactérias heterotróficas cultiváveis, isoladas das amostras de águas e ostras (líquido intervalvar e tecido), coletadas na área do rio Jaguaribe (Pontal do Maceió em Fortim – Ceará)

| Espécies                         | N         | Número de cepas com perfil de resistência por antimicrobiano testado |           |           |           |          |          |          |          |          |          |          |          |
|----------------------------------|-----------|--|-----------|-----------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|                                  |           | AMP  | ATM       | CFL       | CFO       | CLO      | CPM      | CTX      | EST      | FLF      | GEN      | NAL      | NIT      |
| <i>Acinetobacter baumannii</i>   | 1         |  | 1         |           |           |          |          |          |          |          |          |          |          |
| <i>Aeromonas</i> spp.            | 20        | 20   | 6         | 17        | 4         |          | 1        | 1        |          |          |          |          | 1        |
| <i>Citrobacter freundii</i>      | 1         | 1  | 1         |           | 1         |          |          |          |          |          |          |          |          |
| <i>Escherichia coli</i>          | 1         | 1  | 1         |           |           |          |          |          |          |          |          |          |          |
| <i>Moraxella lacunata</i>        | 1         |  |           |           |           |          |          |          |          |          |          |          |          |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>    | 2         | 2  |           | 2         | 2         |          |          | 1        |          |          |          | 2        | 2        |
| <i>Pseudomonas oryzihabitans</i> | 1         | 1  | 1         |           |           |          |          |          |          |          |          |          |          |
| <i>Vibrio alginolyticus</i>      | 5         | 5  | 3         | 5         | 1         |          |          |          |          |          |          |          |          |
| <i>V. cholerae</i>               | 1         | 1  | 1         | 1         | 1         | 1        |          |          | 1        |          |          | 1        |          |
| <i>V. coralliilyticus</i>        | 1         | 1  | 1         | 1         | 1         |          |          |          | 1        |          |          |          | 1        |
| <i>V. ichthyoenteri</i>          | 1         | 1  | 1         | 1         |           |          |          | 1        |          |          |          | 1        | 1        |
| <i>V. litoralis</i>              | 1         |  |           |           |           |          |          |          |          |          |          |          |          |
| <i>V. mediterranei</i>           | 1         | 1  |           |           |           |          |          |          |          |          |          |          |          |
| <i>V. metschnikovii</i>          | 1         |  |           |           |           |          |          |          |          |          |          |          |          |
| <i>V. navarrensis</i>            | 1         |  | 1         | 1         |           |          |          |          |          |          |          |          |          |
| <i>V. ordalii</i>                | 1         | 1  | 1         |           |           |          |          |          | 1        |          |          |          |          |
| <i>V. parahaemolyticus</i>       | 1         | 1  |           | 1         |           |          |          |          |          |          |          |          |          |
| <i>V. pelagius</i> II            | 1         | 1  |           |           |           |          |          |          |          |          |          |          |          |
| <i>V. vulnificus</i> B1          | 1         |  | 1         | 1         | 1         |          |          | 1        | 1        |          |          |          |          |
| <i>Yersinia enterocolitica</i>   | 1         | 1  | 1         |           |           |          |          |          |          |          |          |          |          |
| CNI                              | 15        | 13   | 9         | 4         | 3         |          | 2        | 2        | 4        |          |          |          | 1        |
| <b>Total</b>                     | <b>59</b> | <b>51</b>  | <b>29</b> | <b>34</b> | <b>14</b> | <b>1</b> | <b>3</b> | <b>6</b> | <b>8</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>4</b> | <b>6</b> |

N: número de cepas; CNI: cepas não identificadas; NAL: ácido nalidíxico; AMP: ampicilina; ATM: aztreonam; CFL: cefalotina; CPM: cefepima; CTX: cefotaxima; CFO: cefoxitina; CLO: cloranfenicol; EST: estreptomicina; FLF: florfenicol; GEN: gentamicina; NIT: nitrofurantoina.

Corroborando com a pesquisa, Vaseeharan *et al.* (2005) ressaltam a AMP como o antimicrobiano que demonstrou maior percentual de resistência entre cepas de *Aeromonas* spp. e *Vibrio* spp., ambas com 100% de resistência. Na Itália, cepas de *Vibrio* spp., provenientes de diferentes sistemas de aquaculturas (malacocultura, carcinicultura, piscicultura) foram 100% resistentes a AMP (LAGANÀ *et al.*, 2011). Na Tunísia, cepas de *Aeromonas* spp. isoladas de amostras de água do mar e mexilhões (*Mytilus edulis* e *C. gigas*) foram 100% resistentes a AMP (MEJDI *et al.*, 2010). No Brasil, 90% das cepas de *V. parahaemolyticus*, isoladas de camarões, foram resistentes a AMP (MELO *et al.*, 2011).

As cepas de *Aeromonas* spp. mostraram-se susceptíveis a CLO (100%), CPM (95%), CTX (95%), EST (100%), FLF (100%), GEN (100%), NAL (100%) e NIT (95%). Resultados similares de susceptibilidade foram registrados por Evangelista-Barreto *et al.* (2010), em cepas de *Aeromonas* spp. isoladas do estuário do rio Cocó, Ceará – Brasil, para CLO (100%), NAL (86,8%) e NIT (100%), com exceção apenas para CFL (94,7%).

Contudo, na Turquia, cepas de *Aeromonas* spp. isoladas de águas costeiras do Mar Mediterrâneo, mostraram um alto percentual de resistência quando expostas a alguns desses antimicrobianos, sendo os seguintes: CLO (54,8%), CTX (43,3%), EST (15%), GEN (13,3%), NAL (37,2%) e NIT (78,4%) (MATYAR *et al.*, 2010). No Egito, Zaky, Mansour e Persson (2010) detectaram resistências a AMP e PEN em 100% (21) das cepas de *Aeromonas* spp., isoladas de amostras de peixes e águas do lago Manzala. Esses resultados coincidem com o do presente estudo, no entanto, a susceptibilidade a CLO (76,2%), EST (52,4%), GEN (19%) foi muito inferior às deste trabalho.

As demais espécies das BHC Gram-negativas identificadas mostraram maior percentual de resistência quando expostas a AMP e ATM, com 75% e 62,5%, respectivamente e juntas foram resistentes a 58,3% (7) dos antimicrobianos testados. As quinze (15) cepas que não foram identificadas apresentaram maior resistência a AMP e ATM, com 86,7% e 60%, respectivamente e com resistência a 66,7% (8) aos antimicrobianos avaliados.

As cepas de *Pseudomonas* spp. se mostraram resistentes a AMP (100%), ATM (33,3%), CFL (66,7%), CFO (66,7%), CTX (33,3%), NAL (66,7%) e NIT (66,7%) e susceptíveis aos demais antimicrobianos (CPM, CLO, EST, FLF e GEN).

Os dados desse estudo concordam com Matyar *et al.* (2010) que também detectaram resistência em cepas de *Pseudomonas* spp., isoladas da água costeira do Mar Mediterrâneo, à CTX (8,7%), NAL (26,8%) e NIT (86,2%). Contudo os autores relataram resistências de *Pseudomonas* spp. ao CLO (60,8%), EST (36,2%), GEN (19,6%) diferente do

que foi encontrado no presente trabalho em que as cepas de *Pseudomonas* spp. foram susceptíveis a esses antimicrobianos. De acordo com os pesquisadores, atividades antrópicas (mineração e agricultura intensiva) exercidas próximas à costa da Turquia, contribuíram com a contaminação dos ambientes aquáticos por antimicrobianos e metais pesados, assim promovendo a seleção da microbiota indígena resistente a esses compostos.

Ndi e Barton (2012) relataram a presença de genes de resistência a metais pesados e antimicrobianos em *Pseudomonas* spp., isolados de ambientes de piscicultura, na Austrália, representando um risco à saúde pública através da possível contaminação dos alimentos e fontes de abastecimento humano de água.

As Enterobacteriaceae isoladas foram susceptíveis a 75% (9) dos antimicrobianos testados, com perfil de resistência à ampicilina (100%), aztreonam (100%) e cefoxitina (33,3%). Analisando os resultados de Fernandez-Delgado e Suarez (2009), foi verificada uma total eficácia dos antimicrobianos canamicina, cefixima, ceftazidima, gentamicina, lomefloxacin, netromicin, sulfametoxazol-trimetoprima e tobramicina contra cepas da família Enterobacteriaceae. Entretanto, neste mesmo trabalho, os autores detectaram resistência a ampicilina, ampicilina/sulbactam, carbenicilina e penicilina G em mais de 50% dos isolados, e resistência a cefazolina, cefoxitina e cefradina em 20% dessas bactérias.

Os resultados obtidos estão de acordo com os relatos de Rodriguez, Hariharan e Nimrod (2011), os quais detectaram 5,7% (2) das linhagens Gram-negativas de BHC, extraídas de moluscos (*Strombus gigas* e *Cittarium pica*), em Granada, Caribe, sensíveis a todos os antimicrobianos. Referenciando ainda os mesmos autores, AMP se apresentou como antimicrobiano mais resistente, 60% (21) das cepas, seguida por cefalotina (40%), estreptomicina (28,6%), amoxicilina/ácido clavulânico (20%), tetraciclina (17,1%), cloranfenicol (8,6%), gentamicina (5,7%), ciprofloxacina (2,9%) e sulfametoxazol-trimetoprima (2,9%). Contudo para enrofloxacin todas as cepas se mostraram susceptíveis.

Harnisz, Gołasz e Pietruk (2011) mencionaram a influência do uso de antimicrobianos na aquicultura, como um dos principais fatores responsáveis pela alta resistência da microbiota em ecossistemas aquáticos das reservas ecológicas naturais da União Europeia. A contagem de BHC psicrófilas e mesófilas, resistentes a TET, em águas do rio Drwęca, na Polônia, foram maiores nos pontos próximos da saída de água das fazendas de peixes, que faziam uso de OTC na piscicultura.

As estirpes do gênero *Vibrio* isoladas sobre o meio seletivo ágar TCBS também foram submetidas a teste de antibiograma com as mesmas substâncias usadas para as outras bactérias Gram-negativas (TABELA 10).

Tabela 10 – Perfis de resistência entre cepas de *Vibrio* spp. isoladas das amostras de águas e ostras (líquido intervalvar e tecido), coletadas na área do rio Jaguaribe (Pontal do Maceió em Fortim – Ceará)

| Espécies                  | N         | Número de cepas com perfil de resistência por antimicrobiano testado |           |           |           |          |          |          |           |          |          |           |           |
|---------------------------|-----------|--|-----------|-----------|-----------|----------|----------|----------|-----------|----------|----------|-----------|-----------|
|                           |           | AMP  | ATM       | CFL       | CFO       | CLO      | CPM      | CTX      | EST       | FLF      | GEN      | NAL       | NIT       |
| <i>V. agarivorans</i>     | 2         |  |           | 1         |           | 1        |          |          | 1         |          |          |           | 1         |
| <i>V. alginolyticus</i>   | 6         | 6  | 2         | 5         | 2         |          |          |          | 1         |          |          | 1         | 3         |
| <i>V. calviensis</i>      | 2         | 2  | 1         |           | 1         |          |          |          |           |          |          |           |           |
| <i>V. campbellii</i>      | 1         | 1  | 1         | 1         | 1         | 1        | 1        | 1        |           |          |          | 1         | 1         |
| <i>V. coralliilyticus</i> | 11        | 9  | 2         | 7         | 4         | 1        |          | 1        | 2         |          | 1        | 3         | 3         |
| <i>V. diabolicus</i>      | 1         | 1  |           | 1         |           |          |          |          |           |          |          |           |           |
| <i>V. fisheri</i>         | 1         | 1  |           |           |           |          |          |          |           |          |          |           | 1         |
| <i>V. fortis</i>          | 1         | 1  | 1         | 1         | 1         |          | 1        | 1        |           |          |          | 1         |           |
| <i>V. harveyi</i>         | 1         | 1  | 1         |           | 1         |          |          |          | 1         |          |          |           |           |
| <i>V. ichthyoenteri</i>   | 1         | 1  |           |           |           |          |          |          |           |          |          |           |           |
| <i>V. litoralis</i>       | 4         | 3  | 1         | 2         | 2         |          |          |          | 2         |          |          | 3         | 1         |
| <i>V. metschnikovii</i>   | 1         | 1  | 1         |           | 1         |          |          | 1        |           |          |          |           |           |
| <i>V. mimicus</i>         | 1         | 1  |           |           |           |          |          |          |           |          |          |           |           |
| <i>V. natriegens</i>      | 2         | 2  |           | 1         |           |          |          |          |           |          |          |           |           |
| <i>V. navarrensis</i>     | 4         | 4  | 2         | 3         | 4         | 1        |          |          | 1         |          | 1        | 1         | 3         |
| <i>V. pectenecida</i>     | 5         | 4  | 2         | 1         |           |          |          | 1        |           |          |          |           |           |
| <i>V. ruber</i>           | 17        | 16   | 7         | 8         | 7         |          | 1        | 1        | 3         | 1        |          | 3         | 3         |
| <i>V. susperstes</i>      | 1         |  |           |           |           |          |          |          |           |          |          |           |           |
| <i>V. tasmaniensis</i>    | 5         | 4  | 3         | 2         | 4         |          | 1        | 1        | 1         |          |          | 3         | 2         |
| <i>V. vulnificus</i> B2   | 1         | 1  |           | 1         |           |          |          |          |           |          |          |           |           |
| <b>Total</b>              | <b>68</b> | <b>59</b>  | <b>24</b> | <b>34</b> | <b>28</b> | <b>4</b> | <b>4</b> | <b>7</b> | <b>12</b> | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>16</b> | <b>18</b> |

N: número de cepas; NAL: ácido nalidíxico; AMP: ampicilina; ATM: aztreonam; CFL: cefalotina; CPM: cefepima; CTX: cefotaxima; CFO: ceftioxina; CLO: cloranfenicol; EST: estreptomicina; FLF: florfenicol; GEN: gentamicina; NIT: nitrofurantoína.

Quanto aos v́brios isolados a partir do meio TCBS, todos apresentaram, pelo menos uma (1) cepa resistente aos antimicrobianos testados. A maior frequênciade resistênciade foi apresentada pelas estirpes de *V. ruber* e *V. coralliilyticus*, o que se justifica pelo maior número de cepas isoladas. O *V. ruber* é uma espécie considerada nova, visto que foi descrita pela primeira vez em 2003, com os isolados susceptíveis a AMP, EST e NAL (SHIEH *et al.*, 2003). Em nossa pesquisa, os isolados dessa estirpe mostraram resistênciade a essas mesmas substâncias. O *V. coralliilyticus* também foi descoberto em 2003, contudo o isolado dessa estirpe se mostrou resistente a AMP, mas susceptível a GEN e CLO (BEN-HAIM *et al.*, 2003). Entre os nossos isolados todos foram resistentes a AMP e alguns isolados (9,1%) também se mostraram resistentes a GEN e CLO.

A crescente porcentagem de isolados resistentes a antimicrobianos, segundo alguns autores (BAQUERO; MARTÍNEZ; CANTÓN, 2008; DEFOIRDT; SORGELLOS; BOSSIER, 2011; QI *et al.*, 2009; RAHIMAN *et al.*, 2010; RODGERS; FURONES, 2009) está relacionada ao uso abusivo de antimicrobianos nas práticas aquícolas no tratamento de infecções, profilático e como promotores de crescimentos.

A ampicilina foi o antimicrobiano ao qual a maioria das espécies apresentou resistênciade, com exceção de *V. agarivorans* e *V. susperstes*, que se mostraram 100% susceptíveis a ele. Entre as BHC Gram-negativas a resistênciade à AMP também foi bastante elevada, inclusive nas estirpes de *Vibrio* spp. identificadas. Esses resultados corroboram com as observações de Rodriguez, Hariharan e Nimrod (2011), que mencionaram maior ocorrência de resistênciade à ampicilina em 81,8% (9) das cepas de *Vibrio* spp., extraídas de moluscos (*Strombus gigas* e *Cittarium pica*), em Granada, Caribe; seguido por estreptomicina (36,4%), cefalotina (27,3%), amoxicilina/ácido clavulânico (18,2%) e gentamicina (9,1%).

Na Índia, AMP também foi o antimicrobiano menos eficiente contra cepas de *Vibrio* spp. isoladas de amostras de camarões, águas de incubadoras e viveiros de camarões entre 16 (dezesseis) drogas testadas (VASEEHARAN *et al.*, 2005).

Do mesmo modo, na Tunísia, Mechri *et al.* (2011) mencionaram um alto percentual de resistênciade das estirpes de *Vibrio* spp., isoladas de amostras de bivalves e água do mar (dentro e fora da incubadora, dos tanques de matrizes, larva e pós-larva), à ampicilina (86,9%), co-trimoxazol (28,6%), cloranfenicol (29,8%), ciprofloxacina (5,9%), eritromicina (6,9%), estreptomicina (78,6%), gentamicina (44%), flumequine (5,9%), ácido nalidíxico (5,9%) e tetraciclina (30,9%).

Entre as cepas Gram-negativas, foi observado nas cefalosporinas, um maior percentual de resistênciade aos fármacos de primeiras gerações (1<sup>a</sup> > 2<sup>a</sup> > 3<sup>a</sup> > 4<sup>a</sup>). Esses

resultados eram esperados, uma vez que os antimicrobianos pertencentes à classe citada, foram aperfeiçoando sua eficiência contra bactérias Gram-negativas a cada nova geração (TRABULSI; MIMICA; MIMICA, 2008). Conforme Henriques *et al.* (2006), genes de resistência a antimicrobianos mais antigos, são mais difundidos e detectados entre as populações bacterianas de ambientes estuarinos.

Na tabela 11, as cepas das BHC Gram-positiva estão distribuídas de acordo com seus perfis de resistência e multirresistência por amostra de águas e ostras (líquido intervalvar e tecido), coletadas na área do rio Jaguaribe em Fortim, Estado do Ceará. Na mesma tabela, também se encontra o valor do índice MAR.

Tabela 11 – Perfis de resistência e multirresistência das cepas Gram-positivas das bactérias heterotróficas cultiváveis, isoladas das amostras de águas e ostras (líquido intervalvar e tecido), coletadas na área do rio Jaguaribe (Pontal do Maceió em Fortim – Ceará)

| Perfis de resistência aos antimicrobianos* | Gênero                      | N         |           | MAR  |
|--|-----------------------------|-----------|-----------|------|
|  |                             | Água      | Ostras    |      |
| CFL, CPM, CTX, ERI*, OTC, PEN              | <i>Bacillus</i> sp.         |           | 1         | 0,5  |
| CFL, CPM, CTX*, ERI*, OTC*, PEN            | <i>Bacillus</i> sp.         |           | 1         | 0,5  |
| CFL*, CPM, CTX, ERI*, OTC*, PEN            | <i>Bacillus</i> spp.        |           | 3         | 0,5  |
| CFL*, CPM, CTX*, ERI*, OTC*, PEN           | <i>Bacillus</i> spp.        | 1         | 1         | 0,5  |
| CFL, CPM, CTX, ERI*, PEN                   | <i>Bacillus</i> spp.        |           | 2         | 0,38 |
| CFL*, CPM, CTX, ERI*, PEN                  | <i>Bacillus</i> spp.        | 2         | 1         | 0,38 |
| CFL*, CPM, CTX*, ERI*, PEN                 | <i>Bacillus</i> sp.         | 1         |           | 0,38 |
| CFL, CPM, CTX, OTC, PEN                    | <i>Bacillus</i> sp.         |           | 1         | 0,38 |
| CFL, CPM, CTX, OTC*, PEN                   | <i>Bacillus</i> spp.        | 1         | 1         | 0,38 |
| CFL, CPM, CTX, PEN                         | <i>Bacillus</i> sp.         |           | 1         | 0,25 |
|  | <i>Corynebacterium</i> spp. | 5         | 3         |      |
| CPM, CTX                                   | <i>Listeria</i> spp.        | 1         | 2         | RS   |
|  | CNI                         | 1         |           |      |
| CPM*, CTX*                                 | <i>Corynebacterium</i> spp. | 2         | 2         | RS   |
| CPM, CTX*, ERI, OTC*                       | <i>Kurthia</i> sp.          | 1         |           | 0,38 |
| CPM, CTX*, ERI*, PEN                       | <i>Bacillus</i> sp.         | 1         |           | 0,38 |
| CPM, CTX, OTC*                             | <i>Corynebacterium</i> sp.  |           | 1         | 0,25 |
| CTX*                                       | <i>Corynebacterium</i> sp.  |           | 1         | RS   |
| ERI*                                       | <i>Listeria</i> sp.         |           | 1         | RS   |
| OTC  | <i>Bacillus</i> sp.         | 1         |           | RS   |
| SUT*                                       | <i>Corynebacterium</i> sp.  |           | 1         | RS   |
| <b>Total</b>                               |                             | <b>17</b> | <b>23</b> |      |

\*: resistência intermediária; N: número de cepa; MAR: índice de multirresistência a antimicrobianos; RS: resistência simples; CNI: cepas não identificadas; CFL: cefalotina; CPM: cefepima; CTX: cefotaxima; ERI: eritromicina; OTC: oxitetraciclina; PEN: penicilina G; SUT: sulfazotrim.

Segundo Tavares (2001b), a resistência simples é quando um micro-organismo resiste a apenas uma (1) classe de antimicrobiano, e a multirresistência é caracterizada pela resistência simultânea a mais de um (1) antimicrobiano, de classes diferentes.

Dentre as 40 (quarenta) cepas que apresentaram resistência aos antimicrobianos testados, 50% (20) foram caracterizadas como resistência simples, deste grupo fizeram parte os gêneros: *Bacillus* (2,5%), *Corynebacterium* (35%) e *Listeria* (10%) e a CNI (2,5%). Nos outros 50% (20) das cepas, a multirresistência foi expressa em *Bacillus* (45%), *Corynebacterium* (2,5%) e *Kurthia* (2,5%). A resistência múltipla foi detectada em 42,2% (7) e 56,5% (13) das amostras de água e ostras, respectivamente. A predominância da multirresistência nas amostras de ostras está relacionada ao maior número de *Bacillus* spp., isolados pertencentes a esta amostra, visto que os mesmos, corresponderam a maior parcela da BHC Gram-positivas com este perfil.

O índice MAR variou de 0,25 a 0,5, sendo que a multirresistência variou de três (3) a seis (6) antimicrobianos, pertencentes a duas (2) e quatro (4) classes desses fármacos. O maior percentual de cepas com perfil de multirresistência ficou entre três (3) e quatro (4) classes de antimicrobianos distintos, com 27,5% (11) e 17,5% (7), respectivamente.

O gênero *Bacillus* foi predominante entre as cepas de linhagens Gram-positivas das BHC, isoladas de amostras de ostras e água, e também foi o que obteve maior número de perfis de multirresistência. Ao todo foram cinco (5) diferentes perfis de resistência múltipla deste gênero, expressos em 94,7% (18) das cepas resistentes. A multirresistência variou de quatro (4) a seis (6) antimicrobianos, pertencentes a duas (2) e quatro (4) classes distintas, respectivamente.

As demais cepas pertenciam a outros cinco (5) gêneros (*Corynebacterium*, *Listeria*, *Kurthia*, *Oerskovia* e *Staphylococcus*) e uma (1) CNI, que corresponderam a 52,5% (21) das cepas isoladas resistentes. No entanto, apenas dois (2) perfis de multirresistência foram detectados em duas (2) cepas de gêneros distintos, que foram *Corynebacterium* spp. (CPM, CTX, OTC) e *Kurthia* spp. (CPM, CTX, ERI, OTC).

Os perfis mais comuns foram apresentados pelos representantes do gênero *Bacillus* spp., foram eles: CPM, CTX, PEN; CPM, CTX, ERI, PEN e CFL, CPM, CTX, ERI, PEN. O primeiro perfil foi observado em 41,2% (7) dos isolados resistentes das amostras de água e 65,2% (15) das amostras de ostras. O segundo perfil esteve presente em 35,3% (6) dos isolados das amostras de água e 52,2% (12) das amostras de ostras. E o terceiro perfil foi observado em 23,5% (4) dos isolados das amostras de água e 52,2% (12) das amostras de ostras.

Corroborando com a pesquisa, Sharma e Thapaliya (2009) publicaram dados sobre *Bacillus* spp. e *Corynebacterium* spp., que confirmam os resultados aqui expostos, com 33,3% e 50% das cepas resistentes a uma (1) e duas (2) classes de antimicrobianos, respectivamente, para ambos os gêneros, e com multirresistências a três (3) e quatro (4) classes para *Corynebacterium* spp. e *Bacillus* spp., respectivamente. Entre os dois (2) gêneros citados, o índice MAR variou de 0,29 a 0,57, estes resultados são semelhantes aos detectados na presente pesquisa.

Diferentemente dos resultados exposto na presente pesquisa, Yan *et al.* (2010) alegam multirresistência em 18,9% (17) das cepas de *L. monocytogenes* isoladas de pescados e outros tipos de alimentos chineses. Na Itália, cepas de *L. monocytogenes*, tiveram 8,3% (10) dos isolados resistentes a um (1) antimicrobiano, 2,5% (3) a dois (2) e 0,8% (1) a cinco (5) antimicrobianos (CONTER *et al.*, 2009). De acordo com os mesmos autores, a incidência global de resistência a antimicrobianos em *L. monocytogenes* ainda é relativamente baixa.

Perfis de múltipla resistência à penicilina e eritromicina, entre bactérias Gram-positivas, foram detectadas em efluentes, no Nepal (SHARMA; THAPALIYA, 2009). Os mecanismos de resistência apresentados por esses tipos de bactérias são principalmente, por mutações cromossômicas e/ou aquisições de plasmídios de resistências (ALTERTHUM, 2008a).

Na tabela 12 estão agrupados os perfis de resistência e multirresistência e respectivos valores do índice MAR, apresentados pelas cepas bacterianas Gram-negativas de acordo com a amostra de origem.

Tabela 12 – Perfis de resistência e multirresistência das cepas bacterianas Gram-negativas, isoladas das amostras de águas e ostras (líquido intervalvar e tecido), coletadas na área do rio Jaguaribe (Pontal do Maceió em Fortim – Ceará)

| Perfis de resistência aos antimicrobianos | Espécies                         | N    |        | MAR  |
|---|----------------------------------|------|--------|------|
|   |                                  | Água | Ostras |      |
| AMP                                       | <i>Aeromonas</i> sp.             |      | 1      | RS   |
|   | <i>Vibrio mediterranei</i>       |      | 1      |      |
|   | <i>V. pelagius</i> II            |      | 1      |      |
|   | CNI                              |      | 1      |      |
| AMP, ATM                                  | <i>Pseudomonas oryzihabitans</i> |      | 1      | 0,29 |
|   | CNI                              |      | 1      |      |
| AMP, ATM*                                 | <i>Escherichia coli</i>          |      | 1      | 0,29 |
|   | CNI                              |      | 1      |      |
| AMP*, ATM                                 | CNI                              |      | 1      | 0,29 |
| AMP*, ATM*                                | <i>Yersinia enterocolitica</i>   | 1    |        | 0,29 |

Continua Tabela 12 – Perfis de resistência e multirresistência das cepas bacterianas Gram-negativas, isoladas das amostras de águas e ostras (líquido intervalvar e tecido), coletadas na área do rio Jaguaribe (Pontal do Maceió em Fortim – Ceará)

| Perfis de resistência aos antimicrobianos | Espécies                       | N        |           | MAR  |
|---|--------------------------------|----------|-----------|------|
|   |                                | Água     | Ostras    |      |
| AMP, ATM, CFL*                            | CNI                            |          | 1         | 0,43 |
| AMP, ATM*, CFL                            | <i>Aeromonas</i> sp.           |          | 1         | 0,43 |
| AMP, ATM*, CFL*                           | <i>Aeromonas</i> spp.          | 1        | 2         | 0,43 |
|   | <i>V. alginolyticus</i>        |          | 2         |      |
| AMP, ATM*, CFL, CFO*                      | <i>Aeromonas</i> sp.           |          | 1         | 0,43 |
|   | <i>V. alginolyticus</i>        |          | 1         |      |
| AMP, ATM*, CFL*, CFO*                     | <i>Aeromonas</i> sp.           |          | 1         | 0,43 |
| AMP, ATM*, CFL*, CFO*, EST*, NIT          | <i>V. coralliilyticus</i>      |          | 1         | 0,71 |
| AMP, ATM, CFL*, CFO*, CPM, CTX            | CNI                            |          | 1         | 0,71 |
| AMP, ATM, CFL*, CTX*, NAL, NIT            | <i>V. ichthyoenteri</i>        | 1        |           | 0,71 |
| AMP, ATM*, CFO*                           | <i>Citrobacter freundii</i>    | 1        |           | 0,43 |
| AMP, ATM, CFO*, CPM*, EST*                | CNI                            |          | 1         | 0,57 |
| AMP, ATM, CFO*, CTX*                      | CNI                            |          | 1         | 0,43 |
| AMP, ATM*, CLO*, CFL*, CFO*, EST*, NAL*   | <i>V. cholerae</i>             |          | 1         | 0,86 |
|   | <i>V. ordalii</i>              |          | 1         |      |
| AMP, ATM*, EST*                           | CNI                            |          | 2         | 0,43 |
|   | <i>Aeromonas</i> spp.          |          | 4         |      |
|   | <i>V. alginolyticus</i>        |          | 1         |      |
| AMP, CFL                                  | <i>V. parahaemolyticus</i>     |          | 1         | 0,29 |
|   | <i>Aeromonas</i> spp.          | 1        | 4         |      |
|   | <i>V. alginolyticus</i>        |          | 1         |      |
| AMP, CFL*                                 | CNI                            | 1        |           | 0,29 |
|   | <i>Aeromonas</i> sp.           |          | 1         |      |
| AMP*, CFL                                 | <i>Aeromonas</i> sp.           |          | 1         | 0,29 |
| AMP, CFL, CFO, CTX*, NAL, NIT             | <i>P. aeruginosa</i>           |          | 1         | 0,57 |
| AMP, CFL, CFO, NAL, NIT                   | <i>P. aeruginosa</i>           |          | 1         | 0,57 |
| AMP, CFL, CFO*, NIT*                      | <i>Aeromonas</i> sp.           |          | 1         | 0,43 |
| AMP*, CFL, NIT                            | CNI                            |          | 1         | 0,43 |
| AMP, CFO*                                 | <i>Aeromonas</i> sp.           |          | 1         | 0,29 |
| AMP, CPM, CTX*                            | <i>Aeromonas</i> sp.           | 1        |           | 0,29 |
| AMP, EST*                                 | CNI                            |          | 1         | 0,29 |
| ATM                                       | <i>Acinetobacter baumannii</i> |          | 1         | RS   |
| ATM*, CFL*                                | <i>V. navarrensis</i>          |          | 1         | 0,29 |
| ATM, CFL*, CFO, CTX*, EST*                | <i>V. vulnificus</i> B1        |          | 1         | 0,43 |
| <b>Total</b>                              |                                | <b>7</b> | <b>47</b> |      |

\*: resistência intermediária; N: número de cepas; MAR: índice de multirresistência a antimicrobianos; RS: resistência simples; CNI: cepas não identificadas; NAL: ácido nalidíxico; AMP: ampicilina; ATM: aztreonam; CFL: cefalotina; CPM: cefepima; CTX: cefotaxima; CFO: cefoxitina; CLO: cloranfenicol; EST: estreptomicina; NIT: nitrofurantoína.

Das 54 (cinquenta e quatro) cepas das linhagens de BHC Gram-negativas que apresentaram resistência, 90,7% (49) foram multirresistentes, com exceção apenas das seguintes cinco (5) estirpes: *Acinetobacter baumannii*, *V. mediterranei*, *V. pelagius* II, *Aeromonas* spp. e uma (1) CNI. Diferentemente, Harnisz, Gołaś e Pietruk (2011) detectaram resistência múltipla perante os antimicrobianos para 100% das cepas de *Acinetobacter* spp. e *Aeromonas* spp., isoladas de ecossistemas aquáticos, com influência da aquicultura. Matyar *et al.* (2010) também relataram índices elevados de resistência a antimicrobianos das cepas isoladas de amostras (água, sedimento e camarão) da baía de Iskenderun, na Turquia, com 56,8% das cepas apresentando resistência a sete (7) ou mais antimicrobianos.

Os resultados acima citados são muito superiores aos publicados por Rose *et al.* (2009), visto que, das 472 (quatrocentos e setenta e duas) cepas das BHC Gram-negativas, isoladas de vertebrados marinhos (peixes, mamíferos e aves), na região costeira do nordeste dos Estados Unidos, o perfil de resistência foi notado em 58% das cepas, enquanto 43% foram resistente a mais de um (1) antimicrobiano, contudo, 38% obtiveram índice MAR  $\geq 0,2$ .

Nesta pesquisa, o índice MAR variou de 0,29 a 0,86 nas BHC Gram-negativas e a multirresistência foi observada entre dois (2) e sete (7) antimicrobianos pertencentes a duas (2) e seis (6) classes, e a única espécie de *V. cholerae* isolada neste estudo foi multirresistente a seis (6) classes de antimicrobianos.

Entre os vîbrios a resistência múltipla variou de dois (2) a sete (7) antimicrobianos, pertencentes a duas (2) e seis (6) classes distintas. A multirresistência a duas (2) e três (3) classes de fármacos foi predominante. As espécies de *V. coralliilyticus* e *V. ichthyenteri* foram multirresistentes a cinco (5) classes. Na Coréia, 100% (24) das cepas de *V. parahaemolyticus* apresentaram multirresistência, com alguns isolados resistentes até mesmo 11 (onze) antimicrobianos (JUN *et al.*, 2012). No Brasil, 50% das cepas de *V. parahaemolyticus*, isoladas de camarões em supermercados da cidade de Natal, demonstraram multirresistência aos antimicrobianos testados (MELO *et al.*, 2011).

Analisando os resultados de Rojas *et al.* (2012), foi possível detectar multirresistência perante duas (100%), três (10,5%), quatro (15,8%) e cinco (5,3%) classes de antimicrobianos distintas, em 19 (dezenove) cepas de *V. parahaemolyticus* provenientes de ostras e mexilhões, em São Paulo, Brasil. O índice MAR variou de 0,29 a 0,71, confirmando a multirresistência de todas as cepas estudadas pelos autores.

O maior percentual com perfil de multirresistência ficou entre duas (2) e três (3) classes distintas de antimicrobianos, com 44,4% (24) e 35,2% (19) das cepas que apresentaram resistência, respectivamente. Akinbowale, Peng e Barton (2006) também

obtiveram maiores percentuais de multirresistência entre duas (31,7%) e três (18,3%) classes de antimicrobianos, e atribuíram a multirresistência a pressão exercida pela possível utilização de um (1) ou mais antimicrobianos na aquicultura.

Na Índia, em BHC Gram-negativas isoladas de pescados pelágicos, a multirresistência foi observada diante de duas (2) a sete (7) classes de antimicrobianos, porém, assim como no presente trabalho, a multirresistência frente a duas (2) e três (3) classes foi predominante entre as bactérias (GHOSH; MANDAL, 2010).

No presente estudo, as cepas de *Aeromonas* spp. foram resistentes a uma (1), duas (2) e três (3) classes de antimicrobianos, com 60% (12) das cepas resistentes a duas (2) classes, e apenas 5% (1) delas com resistência simples. Na Tunísia, *Aeromonas* spp., isoladas de bivalves (*Mytilus edulis* e *C. gigas*) cultivados e da água do entorno, a multirresistência dessas bactérias foram conferidas a quatro (4) classes de antimicrobianos (MEJDI *et al.*, 2010). Do mesmo modo, na Turquia, a multirresistência foi detectada em cepas de *Aeromonas* spp. isoladas de águas costeiras (MATYAR *et al.*, 2010). No Brasil, *Aeromonas* spp., provenientes do estuário do rio Cocó, Ceará, apresentaram multirresistência perante duas (2), três (3) e quatro (4) classes de antimicrobianos (EVANGELISTA-BARRETO *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos estão de acordo com as observações de Zhao e Dang (2012), que mencionaram a ocorrência de multirresistência frente a cinco (5) classes de antimicrobianos em 100% (34) dos isolados de *Aeromonas* spp. *gnr*-positivo (gene de resistência a quinolonas), e 67,6% (23) multirresistentes a nove (9) classes distintas. Zaky, Mansour e Persson (2010), também obtiveram alto percentual de *Aeromonas* spp. multirresistentes em 57,1% (12) das cepas, com resistência a duas (28,6%), três (19%) e quatro (9,5%) classes distintas.

Mejdi *et al.* (2011) relatam multirresistência em todas as cepas de *Vibrio* spp. e *Aeromonas* spp., isoladas de ambientes costeiro na Tunísia, com resistência a pelo menos três (3) antimicrobianos e o índice MAR variando entre 0,50 a 0,83. Os autores também mencionaram a presença de gene de virulência (*toxRS*) de *V. cholerae*, em duas (2) cepas de *V. alginolyticus* e uma (1) de *A. hydrophila*, além dos fatores de virulência ( $\beta$ -hemólise, DNase, lecitinase, caseinase, amilase e lipase) expressado pela grande maioria dos isolados.

As estirpes de *Pseudomonas* spp. foram multirresistentes a duas (2) e quatro (4) classes. Contribuindo com a discussão Ndi e Barton (2012) detectaram gene de resistência (*mexB*), responsável pela bomba de efluxo de multidrogas, em *Pseudomonas* spp., isoladas de ambiente de piscicultura, na Austrália. Na Turquia, Matyar *et al.* (2010) observaram também, um grande número de isolados de *Pseudomonas* spp. multirresistentes a antimicrobianos, e

algumas dessas estirpes foram resistentes a até 11 (onze) drogas, mas a grande maioria foram a cinco (5) e seis (6) antimicrobianos. Os mesmos autores acreditam, com base em outros trabalhos, que o alto percentual de multirresistência é proveniente de ambientes de aquicultura e efluentes hospitalares, por meio da transferência de plasmídeos entre as populações bacterianas.

Entre as espécies pertencentes à família das Enterobacteriaceae, a multirresistência ficou entre duas (2) e três (3) classes. Fernandez-Delgado e Suarez (2009) constataram multirresistência por Enterobacteriaceae, provenientes de águas costeiras e ostras (*C. rhizophorae*) no Caribe, a pelo menos cinco (5) antimicrobianos diferentes. Os autores ressaltam sobre o perigo à saúde pública, visto que tanto a água como as ostras são fontes de transmissão de cepas multirresistentes à população humana e ao ambiente.

Já mencionado anteriormente, *Aeromonas* foi o gênero que obteve maior número de espécies identificadas, e entre essas espécies cinco (5) diferentes perfis de multirresistência foram expressos em 95% (19) das cepas. Os vibrios foram o segundo gênero em número de espécies identificadas, e apresentaram, no entanto, nove (9) diferentes perfis de multirresistência em 85,7% (12) das cepas resistentes.

As 13 (treze) cepas bacterianas Gram-negativas não identificadas resistentes apresentaram nove (9) distintos perfis de multirresistência. A resistência múltipla variou de dois (2) a seis (6) antimicrobianos pertencentes a duas (2) e quatro (4) classes distintas, respectivamente.

As demais cepas (7) das BHC Gram-negativas, pertencentes a cinco (5) gêneros distintos, apresentaram quatro (4) diferentes perfis de multirresistência, em 85,7% (6) dos isolados. Em 42,9% (3) das cepas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas oryzihabitans* e *Yersinia enterocolitica*) o mesmo perfil de multirresistência (AMP e ATM) foi observado. A resistência múltipla variou de dois (2) a seis (6) antimicrobianos pertencentes a duas (2) e quatro (4) classes distintas, respectivamente. Multirresistência a duas (2) classes de fármacos foram predominantes em 42,9% (3) das cepas.

Entre esses isolados três (3) perfis de multirresistências foram mais comuns tanto das amostras de água como de ostras: [AMP, CFL]; [AMP, ATM] e [AMP, ATM, CFL]. O primeiro perfil foi verificado em 57,1% (4) dos isolados das amostras de água e 61,7% (29) das amostras de ostras. Esse perfil foi predominante entre as *Aeromonas* spp. e *Vibrio* spp., com 51,5% (17) e 27,3% (9), respectivamente. O segundo perfil foi observado em 57,1% (4) dos isolados das amostras de água e 46,8% (22) das amostras de ostras e foi predominante entre as estirpes não identificadas e os *Vibrio* spp, com 34,6% (9) e 26,9% (7),

respectivamente. O terceiro perfil esteve presente em 28,6% (2) dos isolados das amostras de água e 25,5% (12) das amostras de ostras. A multirresistência a AMP, ATM, CFL foi verificada predominante entre as *Aeromonas* spp. e *Vibrio* spp., ambas em 42,9% (6) das cepas.

Os perfis de multirresistências foram mais frequentes entre as estirpes provenientes das ostras do que da água. Tal fato é explicado pelo maior número de isolados bacterianos pertencerem às amostras de ostra do que à água.

Outras pesquisas já detectaram resistência múltipla em estirpes bacterianas isoladas de amostras ambientais e de animais aquáticos marinhos ou estuarinos (ADELEYE *et al.*, 2011; GIRLICH; POIREL; NORDMANN, 2011; HARNISZ; GOŁAŚ; PIETRUK, 2011; ZHAO; DANG, 2012

Na costa noroeste de Portugal, em um ecossistema multi-estuarino, Henriques *et al.* (2006) concluíram que genes codificam a  $\beta$ -lactamase são frequentemente codificados em bactérias Gram-negativas, isoladas de águas estuarinas. Entretanto, conforme Ferrini *et al.* (2008) e Ottaviani *et al.* (2001), resistência a antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos pode ser detectada tanto em *Vibrio* spp. produtores de  $\beta$ -lactamase como nos desprovidos desta enzima. Assim é possível que as  $\beta$ -lactamases nem sempre sejam o principal mecanismo de resistência das bactérias contra essa classe de antimicrobianos.

De acordo com Li *et al.* (2009), a difusão da resistência a drogas  $\beta$ -lactâmicas é decorrente, principalmente pela expressão de genes que codificam a enzima  $\beta$ -lactamase, contudo, a co-resistência a muitos antimicrobianos de diferentes classes, em isolados de águas residuais, é proveniente de outros mecanismos de resistência, como a bomba de efluxo. Ndi e Barton (2012) relatam a detecção de bomba de efluxo como o principal mecanismo de multirresistência aos antimicrobianos de diferentes classes em bactérias Gram-negativas provenientes de ambientes de aquacultura, na Austrália. Não foram detectados genes que codificam resistências aos  $\beta$ -lactâmicos nas cepas bacterianas.

Assim, diante das afirmações anteriores, é provável que no presente trabalho, a bomba de efluxo seja o principal mecanismo responsável pelas multirresistências encontradas nas estirpes estudadas. Pois, de acordo com Brown e Balkwill (2009) a manutenção de um (1) único ou limitado número de mecanismos de resistência, que abrangem uma maior quantidade de antimicrobianos, seria mais eficaz, pois há um grande gasto de energia na manutenção de vários elementos de resistências (EDENS, 2003).

Na tabela 13 são apresentados os perfis de resistência das cepas de *Vibrio* spp. de acordo com as amostras de origem.

Tabela 13 – Perfis de resistência e multirresistência das cepas de *Vibrio* spp., isoladas das amostras de águas e ostras (líquido intervalvar e tecido), coletadas na área do rio Jaguaribe (Pontal do Maceió em Fortim – Ceará)

| Perfis de resistência aos antimicrobianos   | Espécies                  | N    |        | MAR  |
|---|---------------------------|------|--------|------|
|   |                           | Água | Ostras |      |
| AMP   | <i>V. alginolyticus</i>   |      | 1      | RS   |
|   | <i>V. calviensis</i>      |      | 1      |      |
|   | <i>V. coralliilyticus</i> |      | 3      |      |
|   | <i>V. ichthyoenteri</i>   | 1    |        |      |
|   | <i>V. litoralis</i>       | 1    |        |      |
|   | <i>V. mimicus</i>         |      | 1      |      |
|   | <i>V. natriegens</i>      | 1    |        |      |
|   | <i>V. pectenocida</i>     |      | 2      |      |
| AMP*  | <i>V. ruber</i>           | 1    | 4      | RS   |
| AMP, ATM                                    | <i>V. pectenocida</i>     | 1    |        | 0,29 |
|   | <i>V. ruber</i>           |      | 1      |      |
| AMP, ATM, CFL*, CFO                         | <i>V. ruber</i>           |      | 1      | 0,43 |
| AMP, ATM, CFL, CFO, CLO, CPM, CTX, NAL, NIT | <i>V. campbellii</i>      |      | 1      | 1,0  |
| AMP, ATM, CFL, CFO, CPM, CTX                | <i>V. ruber</i>           |      | 1      | 0,43 |
| AMP, ATM, CFL, CFO, CPM, CTX, NAL           | <i>V. fortis</i>          |      | 1      | 0,57 |
| AMP, ATM, CFL, CFO, CTX*                    | <i>V. coralliilyticus</i> |      | 1      | 0,43 |
| AMP, ATM, CFL, CFO, EST, NAL, NIT           | <i>V. ruber</i>           |      | 1      | 0,86 |
| AMP, ATM, CFL, CFO, EST, NIT                | <i>V. navarrensis</i>     |      | 1      | 0,71 |
| AMP, ATM*, CFL, CFO, EST*, NIT              | <i>V. alginolyticus</i>   |      | 1      | 0,71 |
| AMP, ATM, CFL*, CFO*, NAL                   | <i>V. ruber</i>           |      | 1      | 0,57 |
| AMP, ATM, CFL*, CFO, NAL                    | <i>V. tasmaniensis</i>    |      | 1      | 0,57 |
| AMP, ATM*, CFL, CFO, NIT                    | <i>V. alginolyticus</i>   |      | 1      | 0,57 |
| AMP, ATM*, CFO                              | <i>V. calviensis</i>      |      | 1      | 0,43 |
|   | <i>V. natriegens</i>      |      | 1      |      |
| AMP, ATM*, CFO*, CTX*                       | <i>V. metschnikovii</i>   |      | 1      | 0,43 |
| AMP, ATM, CFO, CPM, CTX, NAL                | <i>V. tasmaniensis</i>    |      | 1      | 0,57 |
| AMP, ATM, CFO, EST*                         | <i>V. harveyi</i>         | 1    |        | 0,57 |
| AMP, ATM, CFO*, EST, GEN, NAL, NIT          | <i>V. coralliilyticus</i> |      | 1      | 0,86 |
| AMP, ATM*, CFO, EST*, NIT                   | <i>V. ruber</i>           |      | 1      | 0,71 |
| AMP, ATM*, CFO*, FLF*, NIT                  | <i>V. ruber</i>           |      | 1      | 0,71 |
| AMP, ATM*, CFO, NIT*                        | <i>V. tasmaniensis</i>    |      | 1      | 0,57 |
| AMP, ATM, CFL, CTX*                         | <i>V. pectenocida</i>     |      | 1      | 0,43 |
| AMP, CFL                                    | <i>V. alginolyticus</i>   |      | 1      | 0,29 |
|   | <i>V. ruber</i>           |      | 1      |      |
|   | <i>V. vulnificus</i> B2   |      | 1      |      |
| AMP, CFL*                                   | <i>V. coralliilyticus</i> |      | 1      | 0,29 |
|   | <i>V. diabolicus</i>      |      | 1      |      |
|   | <i>V. natriegens</i>      |      | 1      |      |
|   | <i>V. ruber</i>           |      | 1      |      |

Continua Tabela 13 – Perfis de resistência e multirresistência das cepas de *Vibrio* spp., isoladas das amostras de águas e ostras (líquido intervalvar e tecido), coletadas na área do rio Jaguaribe (Pontal do Maceió em Fortim – Ceará)

| Perfis de resistência aos antimicrobianos | Espécies                  | N         |           | MAR  |
|---|---------------------------|-----------|-----------|------|
|   |                           | Água      | Ostras    |      |
| AMP, CFL*, CFO*, CLO, NIT                 | <i>V. navarrensis</i>     |           | 1         | 0,57 |
|   | <i>V. coralliilyticus</i> |           | 1         |      |
| AMP, CFL, CFO, EST, NAL                   | <i>V. littoralis</i>      | 1         | 1         | 0,57 |
|   | <i>V. ruber</i>           |           | 1         |      |
| AMP, CFL, CFO, EST, NAL, NIT*             | <i>V. tasmaniensis</i>    |           | 1         | 0,71 |
| AMP, CFL, CFO, GEN, NAL, NIT              | <i>V. navarrensis</i>     |           | 1         | 0,71 |
| AMP, CFL, CFO, NAL                        | <i>V. coralliilyticus</i> |           | 1         | 0,43 |
| AMP, CFL, CLO*                            | <i>V. coralliilyticus</i> |           | 1         | 0,43 |
| AMP, CFL, NAL*                            | <i>V. alginolyticus</i>   |           | 1         | 0,43 |
| AMP, CFL, NIT                             | <i>V. alginolyticus</i>   |           | 1         | 0,43 |
| AMP, NIT                                  | <i>V. fisheri</i>         | 1         |           | 0,29 |
| ATM                                       | <i>V. ruber</i>           | 1         |           | RS   |
| ATM, NAL*, NIT                            | <i>V. littoralis</i>      |           | 1         | 0,43 |
| CFL, CLO*, EST, NIT                       | <i>V. agarivorans</i>     |           | 1         | 0,57 |
| CFL, NIT                                  | <i>V. coralliilyticus</i> |           | 2         | 0,29 |
| <b>Total</b>                              |                           | <b>10</b> | <b>54</b> |      |

\*: resistência intermediária; N: número de cepas; MAR: índice de multirresistência a antimicrobianos; RS: resistência simples; NAL: ácido nalidíxico; AMP: ampicilina; ATM: aztreonam; CFL: cefalotina; CPM: cefepima; CTX: cefotaxima; CFO: cefoxitina; CLO: cloranfenicol; EST: estreptomicina; FLF: florfenicol; GEN: gentamicina; NIT: nitrofurantoína.

Dentre as 68 (sessenta e oito) cepas de *Vibrio* spp. isoladas, 64 (sessenta e quatro) apresentaram resistência aos antimicrobianos testados, destas 71,9% (46) foram multirresistentes. Algumas espécies foram resistentes a cinco (*V. alginolyticus*, 2 espécimes de *V. navarrensis*, *V. ruber* e *V. tasmaniensis*), seis (*V. coralliilyticus* e *V. ruber*) e até mesmo sete (*V. campbellii*) classes de antimicrobianos. O índice MAR variou de 0,29 a 1,0, e a resistência múltipla variou de dois (2) a nove (9) antimicrobianos, pertencentes de duas (2) a sete (7) classes distintas, respectivamente. Vale ressaltar que entre as estipes das BHC Gram-negativas, os maiores índices MAR pertenceram a três (3) espécies de *Vibrio*, que foram *V. cholerae* (0,86), *V. coralliilyticus* (0,71) e *V. ichthyenteri* (0,71).

Das 46 (quarenta e seis) cepas de *Vibrio* spp. multirresistentes, 32 (trinta e dois) diferentes perfis foram expressos. Nas cepas provenientes das amostras de água, 50% (5) foram multirresistentes. Tal característica foi expressa de dois (2) a cinco (5) antimicrobianos, pertencente a duas (2) e quatro (4) classes distintas. Quanto aos isolados das amostras de ostras, a resistência múltipla variou de dois (2) a nove (9) antimicrobianos, pertencentes a duas (2) e sete (7) classes distintas, respectivamente.

Dentre todas as cepas de *Vibrio* spp., seis (6) perfis de multirresistências foram observados como os mais constantes entre os *Vibrio* spp., que foram os seguintes: perfil 1 (AMP e CFL); perfil 2 (AMP e ATM); perfil 3 (AMP, ATM e CFO); perfil 4 (AMP, CFL e CFO); perfil 5 (AMP, ATM e CFL); perfil 6 (AMP, ATM, CFL e CFO).

O perfil 1 (AMP e CFL) foi detectado em 10% (1) dos isolados das amostras de água e 50% (29) das amostras de ostras, totalizando 30 (trinta) cepas, que corresponderam a 44,1% de todos os *Vibrio* spp. O perfil 1 foi detectado em 12 (doze) das 20 (vinte) espécies de *Vibrio* identificadas.

O perfil 2 (AMP e ATM) foi detectado em 20% (2) dos isolados das amostras de água e 39,7% (23) das amostras de ostras, totalizando 25 (vinte e cinco) cepas, que corresponderam a 36,8% de todos os *Vibrio* spp. O perfil 2 foi detectado em 11 (onze) das 20 (vinte) espécies de *Vibrio* identificadas.

O perfil 3 (AMP, ATM e CFO) foi detectado em 10% (1) dos isolados das amostras de água e 32,8% (19) das amostras de ostras, totalizando 20 (vinte) cepas, que corresponderam a 29,4% de todos os *Vibrio* spp. O perfil 3 foi detectado em 11 (onze) das 20 (vinte) espécies de *Vibrio* identificadas.

O perfil 4 (AMP, CFL e CFO) foi detectado em 10% (1) dos isolados das amostras de água e 31% (18) das amostras de ostras, totalizando 19 (dezenove) cepas, que corresponderam a 27,9% de todos os *Vibrio* spp. O perfil 4 foi detectado em oito (8) das 20 (vinte) espécies de *Vibrio* identificadas.

O perfil 5 (AMP, ATM e CFL) foi detectado apenas nos isolados das amostras de ostras em 22,4% (13) das cepas, e corresponderam a 19,1% (13) de todos os *Vibrio* spp. identificados. O perfil 5 foi detectado em oito (8) das 20 (vinte) espécies de *Vibrio* identificadas.

O perfil 6 (AMP, ATM, CFL e CFO) foi detectado apenas nos isolados das amostras de ostras, em 19% (11) das cepas e corresponderam a 16,2% (11) de todos os *Vibrio* spp. identificados. O perfil 6 foi detectado em oito (8) das 20 (vinte) espécies de *Vibrio* identificadas.

Entre as BHC Gram-negativas, os três (3) primeiros perfis de multirresistência que forma expressados pelas estirpes de *Vibrio* spp., também foram os mais frequentes no grupo maior.

Os resultados acima descritos estão em conformidade com os Kitiyodom *et al.* (2010), os quais obtiveram entre 83 (oitenta e três) cepas de *Vibrio* spp., um percentual de resistência a pelo menos um (1) antimicrobiano de 89,2% (74) e mais 26% das cepas

apresentavam multirresistência a pelo menos três (3) classes de antimicrobianos. Os resultados do trabalho citado foram analisados, e assim calculado o índice MAR, que variou de 0,29 a 0,86. Este intervalo foi próximo ao detectado no presente estudo.

Adeleye *et al.* (2011) mencionam multirresistência, a pelo menos três (3) antimicrobianos (augmentin, amoxicilina e cloranfenicol) em 100% (83) das cepas de *Vibrio* spp., provenientes de mariscos (camarões, caranguejos e lulas), com 11,6% (10) dos isolados resistentes a todas as dez (10) drogas (amoxicilina, augmentin, ceftriazone, ciprofloxacina, cloranfenicol, cotrimoxazole, gentamicina, nitrofurantoína, ofloxacina e tetraciclina) testadas, e com 16,2% (14) e 19,7% (17) dos isolados resistentes a nove (9) e oito (8) antimicrobianos, respectivamente.

Na Coreia, cepas de *V. vulnificus*, isoladas de ambientes estuarinos, apresentaram perfis de multirresistência frente a três (amicacina, ampicilina e cefoxitina) e cinco antimicrobianos (amicacina, ampicilina, cefalotina, cefazolina e ciprofloxacina), em 41,2% (7) e 50% (7) das cepas de moluscos e águas estuarinas, respectivamente (KIM, J. H. *et al.*, 2011). Na Nigéria foram detectados perfis de multirresistência frente a dez (amoxicilina, augmentin, ceftriazone, ciprofloxacina, cloranfenicol, cotrimoxazole, gentamicina, nitrofuratoína, ofloxacina e tetraciclina) e quatro (amoxicilina, augmentin, cloranfenicol e nitrofuratoína) antimicrobianos distintos, em 18,8% (8) e 100% (44) das cepas de *Vibrio* spp., isoladas de mariscos (ADELEYE *et al.* 2008). Os autores também observaram que espécies diferentes apresentaram os mesmos perfis, e indivíduos das mesmas espécies tiveram distintos perfis similares ao que foi verificado em nossos resultados.

Na China, 33 (trinta e três) perfis de multirresistência foram detectados em 38 (trinta e oito) cepas de *V. parahaemolyticus*, isolados de frutos do mar (moluscos, crustáceos e equinodermos) na província de Hebei (LIU *et al.* 2009). De acordo com os autores, o uso indiscriminado de diversos antimicrobianos na aquicultura com a finalidade de evitar doenças nos organismos aquáticos cultivados é a principal causa das multirresistências bacterianas.

Colaborando com a discussão, Grohmann, Muth e Espinosa (2003) descrevem a presença de genes de resistência a antimicrobianos codificados em elementos genéticos móveis em bactérias, como os plasmídeos, sendo esta a forma mais eficiente de propagação horizontal da resistência, e uma das principais razões do aumento do número de bactérias multirresistência a esses fármacos.

Nonaka, Ikeno e Suzuki (2007) comprovaram que o uso terapêutico de oxitetraciclina nas pisciculturas, no Japão, favorece o aumento das bactérias resistentes a OTC presentes no sedimento e água costeira. No entanto, nesse mesmo estudo foi verificado que 92

(noventa e dois) dias após a interrupção da utilização desse antimicrobiano ocorreu um declínio significativo entre as populações de BHC resistentes a OTC.

### 5.7 Origem genética da resistência

Resistências codificadas por plasmídeos e transposons podem se difundir de uma espécie bacteriana para outra, e a situação é agravada quando a resistência é propagada entre micro-organismos tradicionalmente patogênicos ao homem e animais (ALTERTHUM, 2008a). Alguns antimicrobianos podem causar resistência cruzada, ou seja, quando um único mecanismo de resistência afeta a vários antimicrobianos (HOLMSTRÖM *et al.*, 2003).

Desenvolvimento de patógenos resistentes em ambientes de aquicultura é bem documentado (FERRINI *et al.*, 2008; MATYAR; KAYA; DINÇER, 2008; MOLINA-AJA *et al.*, 2002), e as provas de transferência da resistência codificada em plasmídeos, entre bactérias de ambientes de aquicultura e as patogênicas aos seres humanos, já foram reportado na literatura global (CABELLO, 2006; LAI, Z.-F. *et al.*, 2009; POIREL *et al.*, 2005a).

Na tabela 14, estão dispostos os resultados do teste de *cura* de plasmídios, listados em ordem crescente do número de cepas. Foram submetidas ao agente curagênico *acridine orange* 33,9% (20) das 59 (cinquenta e nove) cepas das BHC Gram-positivas, que apresentaram perfis de multirresistentes aos antimicrobianos. Das 12 (dozes) drogas utilizadas no antibiograma seis (6) foram investigadas quanto à origem da resistência.

Tabela 14 – Caracterização da origem da resistência em linhagens de bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC) Gram-positivas isoladas das amostras de águas e ostras (líquido intervalvar e tecido), coletadas na área do rio Jaguaribe (Pontal do Maceió em Fortim – Ceará)

| Antimicrobianos | Símbolo | Nº de cepas | Caracterização da resistência |            |
|-----------------|---------|-------------|-------------------------------|------------|
|                 |         |             | Cromossômica                  | Plasmidial |
| Oxitetraciclina | OTC     | 12          | 12                            | 0          |
| Eritromicina    | ERI     | 16          | 14                            | 2          |
| Cefalotina      | CFL     | 18          | 6                             | 12         |
| Penicilina G    | PEN     | 19          | 19                            | 0          |
| Cefepima        | CPM     | 20          | 15                            | 5          |
| Cefotaxima      | CTX     | 20          | 18                            | 2          |

Dentre os antimicrobianos submetidos ao teste de *cura* de plasmídeo, apenas para OTC e PEN as cepas de BHC Gram-positivas não apresentaram resistência plasmidial. Os demais obtiveram percentuais de 10% (2), 12,5% (2), 25% (5) e 66,7% (12) para CTX, ERI, CPM e CFL, respectivamente. A resistência potencialmente cromossômica foi observada nas

cepas frente a todos os antimicrobianos testados, sendo esta resistência predominante a OTC, PEN, CTX, ERI e CPM com 100% (12), 100% (19), 90% (16), 87,5% (14), 75% (15) dos isolados, respectivamente.

Conforme Grohmann, Muth e Espinosa (2003) existem poucas informações sobre genes de resistências codificados em elementos móveis, em bactérias Gram-positivas, visto que, nas últimas décadas, apenas as bactérias Gram-negativas tiveram uma grande ascensão nas pesquisas detalhadas sobre os elementos genéticos de transferência de resistência a antimicrobianos.

Perreten, Kolloffel e Teuber (1997) detectaram a presença de genes *tetM* em bactérias Gram-positivas, que conferiam resistência à tetraciclina, rifampicina e ácido fusídico, codificados tanto em plasmídios como no cromossomo. Os autores também relataram a transconjugação desses genes entre BHC Gram-positivas de diferentes gêneros (*Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Listeria* e *Staphylococcus*) e aquisição da resistência a tetraciclina, rifampicina e ácido fusídico.

Nonaka, Ikeno e Suzuki (2007) mencionam a presença de dois (2) genes (*tetM-a* e *tetM-b*), que codificam resistência a OTC, tanto em BHC Gram-positivas como em Gram-negativas, isoladas de sedimentos e águas de ambientes de aquicultura, no Japão. Os dois (2) genes foram identificados nos quatro (4) gêneros de BHC Gram-positivos (*Bacillus*, *Lactobacillus*, *Paenibacillus* e *Sporosarcina*). Os pesquisadores também relatam similaridade de *tetM-a* com os genes encontrados em *Streptococcus agalactiae* (AE014233) e *Clostridium perfringens* (AF329848), e a maior proximidade *tetM-b* com o gene presente em um (1) transposon conjugativo (X04388) de *Streptococcus*.

Na China, Gao *et al.* (2012) mencionam que os resultados de análise filogenética sobre os genes de resistências, apontam para existência de transferência genética entre bactérias entéricas (por exemplo, *Enterococcus* spp.) e indígenas (por exemplo, *Bacillus* spp.), em decorrência da presença de *sut1* em ambos os micro-organismos, cujos genes estavam intimamente ligados na árvore filogenética.

Na tabela 15, estão dispostos os resultados do teste de cura de plasmídios, listados em ordem crescente do número de cepas. Foram submetidas ao agente curagênico *acridine orange* 83% (49) das 59 (cinquenta e nove) cepas das BHC Gram-negativas, que apresentaram perfil de multirresistentes frente aos antimicrobianos. Das 12 (doze) drogas utilizadas no antibiograma, dez (10) foram investigadas quanto à origem da resistência.

Tabela 15 – Caracterização da origem da resistência em linhagens de bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC) Gram-negativas isoladas das amostras de águas e ostras (líquido intervalvar e tecido), coletadas na área do rio Jaguaribe (Pontal do Maceió em Fortim – Ceará)

| Antimicrobianos  | Símbolo | Nº de cepas | Caracterização da resistência |            |
|------------------|---------|-------------|-------------------------------|------------|
|                  |         |             | Cromossômica                  | Plasmidial |
| Cloranfenicol    | CLO     | 1           | 0                             | 1          |
| Cefepima         | CPM     | 3           | 1                             | 2          |
| Ácido nalidíxico | NAL     | 4           | 1                             | 3          |
| Cefotaxima       | CTX     | 6           | 1                             | 5          |
| Nitrofurantoína  | NIT     | 6           | 5                             | 1          |
| Estreptomicina   | EST     | 8           | 1                             | 7          |
| Cefoxitina       | CFO     | 14          | 4                             | 10         |
| Aztreonam        | ATM     | 28          | 16                            | 12         |
| Cefalotina       | CFL     | 34          | 23                            | 11         |
| Ampicilina       | AMP     | 47          | 45                            | 2          |

Os antimicrobianos que apresentaram uma maior frequência de resistência relacionada a plasmídeo, foram: CPM, CFO, NAL, CTX, EST e CLO. A resistência potencialmente cromossômica foi verificada para os seguintes antimicrobianos: ATM, CFL, NIT e AMP.

Conforme Kim, J. H. *et al.* (2011), a resistência de *Vibrio* spp. frente aos antimicrobianos pertencente às classes de aminoglicosídeos (EST e GEN) e cefalosporinas (CFL, CPM, CTX e CFO), podem proceder de genes codificados em integrons cromossômicos ou em plasmídios.

Akinbowale, Peng e Barton (2006) obtiveram um percentual de extração de plasmídeo de 74,4% (64) em cepas de BHC Gram-negativas, que apresentaram resistência pelo menos a um (1) antimicrobiano. Yano *et al.* (2011) detectaram genes de resistência a TET (*tet-A*, *tet-C*, *tet-D* e *tet-E*), codificados no plasmídeo de 94% (47) dos isolados de BHC Gram-negativos de camarões, na Tailândia.

Resistências pasmidiais e cromossômicas frente à quinolonas (NAL e CIP), foram observadas em cepas de *Pseudomonas* spp., *Pseudoalteromonas* spp., *Shewanella algae*, *Citrobacter freundii* e outras Enterobacteriaceae, isoladas de águas costeiras da Baía de Jiaozhou, na China (ZHAO; DANG, 2012). Genes de resistência a quinolonas (NAL e CIP) codificados em plasmídios e cromossomos, também foram detectado em cepas de *Vibrio* spp., na Espanha (POIREL *et al.*, 2005a, 2005b) e no Japão (SAGA *et al.*, 2005).

No Chile, cerca de 100 (cem) toneladas de quinolonas são utilizadas por ano, na medicina veterinária, essa cifra representa quase que dez (10) vezes, a utilizada na medicina humana, sendo que a maior parte do uso veterinário é destinada a aquicultura (CABELLO,

2006). Segundo Zhao e Dang (2012) a utilização extensiva e excessiva de quinolonas na profilaxia estimula a propagação de patógenos resistentes aos antimicrobianos clínicos, visto que, os mecanismos de resistência às quinolonas envolvem tanto cromossomos como plasmídeos.

Os resultados obtidos estão de acordo com as observações de Girlich, Poirel e Nordmann (2011), os quais detectaram uma variedade de genes de *ESBL* (espectro estendido a  $\beta$ -lactamases), incluindo *blaVEB-1a*, *blaSHV-12*, *blaPER-1*, *blaPER-6*, *blaTLA-2*, e *blaGES-7*, responsáveis pela resistência em antibióticos, pertencentes à classe das cefalosporinas (ceftazidima, cefepima e cefotaxima), codificados em cromossomos ou plasmídios de *Aeromonas* spp., originárias do rio Sena, em Paris, França. Conforme os mesmos autores, cepas bacterianas com resistência intrínseca ou adquirida aos antimicrobianos são comumente encontradas em ambientes aquáticos, esta afirmação explicaria os resultados encontrados no presente estudo.

Corroborando com a pesquisa, Zaky, Mansour e Persson (2010) associaram a presença de plasmídios em cepas de *Aeromonas* spp. com a multirresistência demonstrada pelas mesmas *in vitro*. Os autores constataram resistência bacteriana a quatro (4) e cinco (5) antimicrobianos (AMP, PEN, CLO, EST e GEN), em cepas com quatro (4) e três (3) plasmídios, respectivamente.

No Brasil, Silva (2009) relata resistência plasmidial e potencialmente cromossômica em cepas de *Aeromonas* spp., isoladas do estuário do rio Cocó, Estado do Ceará, frente a AMP, CFL e NAL.

Conforme Mendes *et al.* (2006), várias BHC Gram-negativas de importância clínica, incluindo membros da família Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp., foram encontrados para produzir enzimas  $\beta$ -lactamases, nos portadores dos genes *M $\beta$ L*. No entanto, estes genes são incorporados em elementos genéticos móveis, de fácil transmissão entre micro-organismos Gram-negativos, podendo serem codificadas por cassetes gênicos localizados no cromossomo ou plasmídio bacterianos.

Woodford *et al.* (2000) relatam a existência de genes de resistência a antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos codificados tanto em cromossomos como em plasmídios de Enterobacteriaceae. Quinteira, Sousa e Peixe (2005) mencionam em *Pseudomonas aeruginosa*, a presença de gene carbapenemase (*blaVIM-2*), associada com um carbenicillinase (*blaP1b*) e dos genes de resistência aminoglicosídeos (*aacA4* e *aadA2*). Livermore (2002) cita a existência de resistência plasmidial a  $\beta$ -lactâmicos, juntamente com

aminoglicosídeos, difundidas entre as estirpes de *P. aeruginosa*, e da resistência intrínseca dessas bactérias, frente às classes de penicilinas e cefalosporinas de antimicrobianos.

Higgins *et al.* (2005) detectaram a presença de gene (*blaOXA-58*) de resistência plasmidial em *Acinetobacter baumannii*, com perfil de hidrólise para antimicrobianos pertencentes à classe das penicilinas (ampicilina, benzilpenicilina, ticarcilina e piperacilina).

Contribuindo com a discussão, Mendes *et al.* (2007) mencionam a presença do gene *aac (6')-31* codificado em plasmídios ou cromossomos de *Acinetobacter spp.*, e em cromossomo de *Pseudomonas spp.*, associados à resistência frente a antimicrobianos pertencentes aos aminoglicosídeos (amicacina e tobramicina) e  $\beta$ -lactâmicos (ampicilina, aztreonam, ceftazidima, cefepima, imipenem e outros).

Nas águas costeiras da baía de Jiaozhou, na China, Dang *et al.* (2008) observaram a quantificação de BHC resistentes a CLO variando de  $1,9 \times 10^2$  a  $5,2 \times 10^5$  UFC/mL, e detectaram genes (*cat I* e *cat III*) que codificam a resistência a CLO inseridos no plasmídio bacteriano, em 12,5% (6) das estirpes de BHC Gram-negativas. Entretanto, os mecanismos moleculares que codificam a resistência a CLO, não foram desvendados pelo método utilizado.

Na tabela 16, estão dispostos os resultados do teste de *cura* de plasmídios, listados em ordem crescente do número de cepas de *Vibrio spp.*, isoladas a partir do meio TCBS. Foram submetidas ao agente curagênico *acridine orange* 67,6% (46) das 68 (sessenta e oito) cepas de *Vibrio spp.*, cujos isolados apresentaram perfil de multirresistentes aos antimicrobianos. Das 12 (dozes) drogas utilizadas no antibiograma dez (10) foram investigadas quanto à origem da resistência. Os *Vibrio spp.* foram 100% sensíveis a FLF, GEN e CLO no novo antibiograma, sendo assim confirmada a resistência como plasmidial, e a CPM foi o único antimicrobiano ao qual as cepas continuaram 100% resistentes após a ação do agente curagênico indicando uma potencial origem cromossômica.

Resistências tanto de origem plasmidial quanto potencialmente cromossômica foram identificadas aos seguintes antimicrobianos: CTX, EST, NAL, NIT, ATM, CFO, CFL e AMP. *Vibrio spp.* apresentaram maior frequência de resistência plasmidial à EST, CFO, CTX e NIT. Aos perfis de resistência potencialmente cromossômica foram verificados a ATM, CFL e AMP, principalmente. Analisando os resultados para o NAL é possível verificar que entre os isolados testados, cada metade apresentou uma origem genética diferente para a resistência a essa droga.

Tabela 16 – Caracterização da origem da resistência em cepas de *Vibrio* spp. isoladas das amostras de águas e ostras (líquido intervalvar e tecido), coletadas na área do rio Jaguaribe (Pontal do Maceió em Fortim – Ceará)

| Antimicrobianos  | Símbolo | Nº de cepas | Caracterização da resistência |            |
|------------------|---------|-------------|-------------------------------|------------|
|                  |         |             | Cromossômica                  | Plasmidial |
| Florfenicol      | FLF     | 1           | 0                             | 1          |
| Gentamicina      | GEN     | 2           | 0                             | 2          |
| Cloranfenicol    | CLO     | 4           | 0                             | 4          |
| Cefepima         | CPM     | 4           | 4                             | 0          |
| Cefotaxima       | CTX     | 7           | 2                             | 5          |
| Estreptomicina   | EST     | 12          | 4                             | 8          |
| Ácido nalidíxico | NAL     | 16          | 8                             | 8          |
| Nitrofurantoína  | NIT     | 18          | 1                             | 17         |
| Aztreonam        | ATM     | 24          | 17                            | 7          |
| Cefoxitina       | CFO     | 28          | 9                             | 19         |
| Cefalotina       | CFL     | 33          | 24                            | 9          |
| Ampicilina       | AMP     | 41          | 38                            | 3          |

Zanetti *et al.* (2001) estudando o perfil de susceptibilidade em cepas ambientais de *Vibrio* spp., não conseguiram estabelecer correlação específica entre resistência à AMP e à presença de plasmídeos, no entanto, os autores puderam observar que 50% (24) das cepas resistentes a esta droga abrigavam plasmídeos. Já Molina-Aja *et al.* (2002) encontraram resistência a AMP e CFL, tanto plasmidial quanto potencialmente cromossômica em cepas de *Vibrio* spp., provenientes de camarões de cultivo no México. Segundo os autores, a resistência a  $\beta$ -lactâmicos está difundida entre os víbrios independentemente do local e fonte de isolamento.

Em uma pesquisa realizada por Manivasagan *et al.* (2010), os autores detectaram de um (1) a três (3) plasmídeos entre cepas de *Vibrio* spp. recuperadas de ecossistemas costeiros indianos, influenciados por fazendas de carcinicultura. Esses elementos genéticos móveis apresentaram tamanhos que variam de 11 a 112kb e estavam relacionados à expressão de resistência a quase todos os antimicrobianos testados (ácido nalidíxico, ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, gentamicina, penicilina G, novobiocina, rifamicina e tetraciclina). As demais cepas apresentaram resistências cromossômicas (93,7%) para os antimicrobianos citados.

Chakraborty, Surendran e Chakraborty (2009) relatam que não houve mudança da resistência perante AMP, EST e CLO após a perda do plasmídeo em cepas de *V. parahaemolyticus* isolados de ambientes de carcinicultura na cidade de Cochim, na costa sudoeste da Índia, sugerindo uma resistência potencialmente cromossômica. Contribuindo com os resultados, Rebouças (2010) também relata apenas a resistência plasmidial ao FLF,

em *V. orientalis*, isolados de ambiente de piscicultura, no Estado do Ceará, Brasil. Ainda no Ceará, Rebouças *et al.* (2011) detectaram resistências plasmidiais e potencialmente cromossômicas a AMP e CFO entre cepas de *Vibrio* spp. isoladas de amostras de água das incubadoras e hepatopâncreas dos camarões de três (3) fazendas. Entre os mesmos isolados, a resistência a NAL foi relacionada ao cromossomo.

De acordo com Saga *et al.* (2005), o gene *qnr* foi o primeiro identificado como um determinante de resistência transferível a quinolona em um plasmídeo presente em *Klebsiella pneumoniae*, e posteriormente, já foi detectado em diversas Enterobacteriaceae.

Diferentemente dos resultados encontrados para ATM no presente trabalho onde 70,8% (17) das cepas de *Vibrio* spp. mantiveram o marco de resistência após a cura, Rocha (2011) detectou apenas resistência plasmidial ao ATM entre as cepas de *Vibrio* spp. isoladas de amostras estuarinas.

Conforme alguns autores (OTTAVIANI *et al.*, 2001; RODRIGUEZ; HARIHARAN; NIMROD, 2011) *Vibrio* spp. isolados de pescado podem apresentar mecanismos de resistência a antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos (ampicilina, carbenicilina, cefepima, cefotaxima e penicilina G). A alta crescente da frequência de resistência plasmidial é preocupante no mundo, principalmente em cepas ambientais. Mejdí *et al.* (2010) visualizaram uma grande distribuição de genes do *V. cholerae* entre *Vibrio* spp., isolados de moluscos (mexilhões e ostras) e da água do entorno, na Tunísia; sete (21,2%) cepas apresentaram mais de dois (2) genes de virulência de *V. cholerae*, e 18 (54,5%) cepas foram positivas para o gene *toxR*.

O alto percentual de resistência encontrada pode ser explicado pela prática abusiva de antimicrobianos inseridos na ração, que é utilizada como promotora de crescimento, na aquicultura. Diante desta situação, bactérias presentes na água resistentes a esses fármacos são selecionadas, assim podendo difundir os genes de resistência em ambientes costeiros, que pode ser favorecido pela troca de água, no momento da despesca realizada na aquicultura (THOMPSON; LIDA; SWINGS, 2004). Vale ressaltar que a região de influência do estuário do rio Jaguaribe é marcada pela presença marcante de fazendas de cultivo de camarão (VIEIRA *et al.*, 2007).

A propagação da resistência aos antimicrobianos da aquicultura tem sido abordada por vários estudos (AKINBOWALE; PENG; BARTON, 2006; MANIVASAGAN *et al.*, 2010; MOLINA-AJA *et al.*, 2002; REBOUÇAS *et al.*, 2011). Kitiyodom *et al.* (2010) concluíram, que a grande diversidade de mecanismos de resistência e a presença de elementos genéticos móveis em culturas de víbrios de camarões cultivados, na Tailândia, contribuem

para a disseminação da multirresistência entre *Vibrio* spp. e outras bactérias aquáticas. Esses resultados e os de vários autores (MANIVASAGAN *et al.*, 2010; TENDENCIA; PENÃ *et al.*, 2001) intensifica a afirmação, de que o uso de antimicrobiano na carcinicultura, contribui para a transmissão de resistência a micro-organismos comensais e ou patogênicos, assim como os resultados apurados neste estudo.

### 5.8 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Para a realização do teste da concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos foram selecionados fármacos que aparecerem com maior frequência nos perfis de multirresistência. Assim para as bactérias Gram-positivas foi determinada a CIM para penicilina G e para as estirpes Gram-negativas e víbrios foi determinada a CIM para ampicilina. Na tabela 17 estão os resultados da CIM para PEN e AMP frente às cepas multirresistentes das BHC Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente.

Tabela 17 – Concentração inibitória mínima (CIM) da penicilina G (PEN) e ampicilina (AMP), por linhagem de bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC) Gram-positiva e Gram-negativa multirresistente, respectivamente isoladas das amostras de águas e ostras (líquido intervalvar e tecido), coletadas na área do rio Jaguaribe (Pontal do Maceió em Fortim – Ceará)

| BHC Gram +                     | N         | Penicilina G (PEN) µg/mL |          |          |          |          |          |           |          |
|--------------------------------|-----------|--------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|----------|
|                                |           | 2                        | 4        | 8        | 16       | 32       | 64       | 128       | >128     |
| <i>Bacillus</i> spp.           | 18        |                          |          |          |          | 2        | 13       | 2         | 1        |
| BHC Gram –                     | N         | Ampicilina (AMP) µg/mL   |          |          |          |          |          |           |          |
|                                |           | 2                        | 4        | 8        | 16       | 32       | 64       | 128       | >128     |
| CNI                            | 12        |                          |          |          | 2        | 1        | 2        | 4         | 3        |
| <i>Aeromonas</i> spp.          | 19        |                          |          |          | 1        |          | 4        | 14        |          |
| <i>Escherichia coli</i>        | 1         |                          |          |          |          |          |          | 1         |          |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | 2         |                          |          |          |          |          |          | 2         |          |
| <i>P. oryzihabitans</i>        | 1         |                          |          |          |          | 1        |          |           |          |
| <i>Vibrio alginolyticus</i>    | 5         |                          |          |          |          |          |          | 4         | 1        |
| <i>V. cholerae</i>             | 1         |                          |          |          |          |          |          |           | 1        |
| <i>V. coralliilyticus</i>      | 1         |                          |          |          |          |          |          |           | 1        |
| <i>V. ichthyoenteri</i>        | 1         |                          |          |          |          |          | 1        |           |          |
| <i>V. ordalii</i>              | 1         |                          |          |          |          |          |          | 1         |          |
| <i>V. parahaemolyticus</i>     | 1         |                          |          |          |          | 1        |          |           |          |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | 1         |                          |          |          | 1        |          |          |           |          |
| <b>Total</b>                   | <b>46</b> | <b>0</b>                 | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>4</b> | <b>3</b> | <b>7</b> | <b>26</b> | <b>6</b> |

CNI – cepas não identificadas.

Entre as BHC Gram-positivas, a CIM da penicilina foi determinada apenas para as cepas do gênero *Bacillus* porque apresentaram perfis de multirresistência. A concentração mínima de PEN para esses isolados variou de 32 a > 128 µg/mL. O maior percentual de isolados (72,2%, (13) foi susceptível a uma concentração de 64 µg/mL de PEN. No entanto, foi verificado CIM de PEN de 128 e > 128 µg/mL para 11,1% (2) e 5,6% (1) das cepas, respectivamente.

Entre as BHC Gram-negativas, a CIM de AMP variou entre 16 a >128 µg/mL. O maior número de cepas (26; 56,5%) foi susceptível a uma concentração mínima de ampicilina de 128 µg/mL. Essa foi a concentração limite para diversos gêneros: 14 (73,7%) *Aeromonas* spp., 1 (100%) *Escherichia coli*, 2 (100%) *Pseudomonas aeruginosa*, 4 (75%) *V. alginolyticus*, 1 (100%) *V. ordalii* e de 4 (33,3%) cepas não identificadas.

Das 46 (quarenta e seis) cepas, 13% (6) não foram susceptíveis a uma CIM de AMP até 128 µg/mL, que foram representadas por 1 (25%) cepa de *V. alginolyticus*, 1 (100%) de *V. cholerae*, 1 (100%) de *V. coralliilyticus* e por 3 (25%) CNI.

A CIM de 128 µg/mL de AMP foi predominante entre as diversas bactérias testadas, obtendo percentuais de 80% (8), 73,7% (14), 60% (3) e 58,3% (7) entre *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp. para as demais espécies e CNI, respectivamente.

Colaborando com a discussão do presente estudo, Tomé *et al.* (2008) detectam CIM de PEN, variando de 0,125 a 1 µg/mL, em BHC Gram-positivas, isoladas de salmão (*Salmo salar*) fresco eviscerado oriundo de viveiros da Noruega e filés defumados de salmão, coletados na cidade de Porto, em Portugal. No Sri Lanka, Perera e Ranasinghe (2012) mencionaram resultados similares ao do presente estudo, onde a CIM de PEN, em 112 (cento e doze) cepas de *B. cereus* variou de 32 a 256 µg/mL.

Turnbull *et al.* (2004) relatam que em 157 (cento e cinquenta e sete) cepas de *Bacillus* spp., isoladas de uma variedade de fontes clínicas e ambientais, nos Estados Unidos e Reino Unido, 53,5% (84) apresentaram resistência à PEN. Na Dinamarca, Rosenquist *et al.* (2005) relatam cepas de *Bacillus* spp. provenientes de diferentes alimentos, com MIC de PEN variando de 8 a >128 µg/mL. Segundo os mesmos autores, dos oito (8) antimicrobianos (ciprofloxacina, cloranfenicol, eritromicina, estreptomicina, gentamicina, penicilina G, tetraciclina e vancomicina) testados, apenas PEN foi ineficiente contra as cepas de *Bacillus* spp. Além disso, todas as 40 (quarenta) cepas analisadas tinham genes ou componentes de toxinas envolvidas em doenças diarréicas humanas.

Resultados similares foram divulgados por Huang *et al.* (2011) que relatam CIM de AMP variando de 32 a > 1024 µg/mL entre bactérias Gram-negativas isoladas de efluentes

secundários de estação de tratamento de águas, na China. Resultados mais elevados da CIM de AMP, com CIM  $\geq 200$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  de PEN em 76,9% (10) dos isolados, foram mostrados por Ramsden *et al.* (2010), em cepas de BHC Gram-negativas, provenientes de efluentes de estações de tratamento de águas, também na China. Segundo os autores, esses altos valores para a CIM de AMP, ocorreram porque essas bactérias haviam passado por recentes eventos de transferência laterais de genes, que promoveram também a resistência múltipla aos antimicrobianos testados (amoxicilina, ampicilina, clorotetraciclina; eritromicina, sulfametoxazol, tetraciclina, tilosina e trimetoprima).

Ismail *et al.* (2011) relatam a CIM de AMP  $> 16$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ , em todas as 31 (trinta e uma) cepas de *V. cholerae*, isoladas de 31 (trinta e um) surtos de cólera confirmados, na África do Sul. Os autores ainda detectaram o gene *blaTEM* no plasmídio responsável pela codificação da MET-63  $\beta$ -lactamase, em todas as dez (10) cepas investigadas.

Liu *et al.* (2009) discorrem sobre 38 (trinta e oito) cepas *V. parahaemolyticus*, isolados a partir de fontes de frutos do mar (moluscos, crustáceos e equinodermos) na província de Hebei, na China, que apresentaram MIC de AMP  $\geq 32$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Corroborando com o presente estudo, Akinbowale, Peng e Barton (2006) detectaram em 58 (cinquenta e oito) linhagens de BHC Gram-negativas, a CIM de AMP variando de 16 a  $>128$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ , sendo que a concentração  $>128$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  correspondeu a mais de 60% dos isolados de ambiente e animais da aquicultura australiana.

Na Índia, cepas de BHC Gram-negativas provenientes de ambientes de carcinicultura, obtiveram CIM de AMP, variando de 89,5 a 222,7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . O *V. alginolyticus* (5) e *V. cholerae* (3) tiveram uma CIM de AMP  $> 128$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  em 100% das cepas (VASEEHARAN *et al.*, 2005).

Ramalivhana, Obi e Moyo (2009) relatam resultados da CIM de AMP muito superiores, aos observados no presente trabalho. Em 150 (cento e cinquenta) cepas de *Aeromonas* spp., isoladas de amostras de água na província de Limpopo, África do Sul. Segundo os autores, a CIM de AMP foi de 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e  $> 512$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ , em 24,7% (37) e 75,3% (113) das cepas, respectivamente.

Conforme Rodriguez, Hariharan e Nimrod (2011), o surgimento de cepas ambientais de *Pseudomonas* spp. resistentes a antimicrobianos vem aumentando, e esta situação gera uma série de preocupações para a saúde pública, uma vez que existem espécies patogênicas ao homem pertencentes a esse gênero, assim dificultando a terapêutica das infecções bacterianas.

Os resultados da determinação da CIM da ampicilina, para as cepas multirresistentes de *Vibrio* spp., isoladas a partir do meio TCBS, estão expostos na tabela 18.

Tabela 18 – Concentração inibitória mínima (CIM) da ampicilina (AMP) para as cepas de *Vibrio* multirresistentes isoladas das amostras de águas e ostras (líquido intervalvar e tecido), coletadas na área do rio Jaguaribe (Pontal do Maceió em Fortim – Ceará)

| Espécies                  | N         | Ampicilina (AMP) µg/mL |          |          |          |          |           |           |          |
|---------------------------|-----------|------------------------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|----------|
|                           |           | 2                      | 4        | 8        | 16       | 32       | 64        | 128       | >128     |
| <i>V. alginolyticus</i>   | 5         |                        |          |          |          |          |           | 5         |          |
| <i>V. calviensis</i>      | 1         |                        |          |          | 1        |          |           |           |          |
| <i>V. campbellii</i>      | 1         |                        |          |          | 1        |          |           |           |          |
| <i>V. coralliilyticus</i> | 5         |                        |          |          |          |          | 4         | 1         |          |
| <i>V. diabolicus</i>      | 1         |                        |          |          |          |          | 1         |           |          |
| <i>V. fisheri</i>         | 1         |                        |          |          |          | 1        |           |           |          |
| <i>V. harveyi</i>         | 1         |                        |          |          |          | 1        |           |           |          |
| <i>V. litoralis</i>       | 2         |                        |          |          |          |          |           | 2         |          |
| <i>V. metschnikovii</i>   | 1         |                        |          |          |          |          | 1         |           |          |
| <i>V. natrigens</i>       | 1         |                        |          |          |          |          |           | 1         |          |
| <i>V. navarrensis</i>     | 3         |                        |          |          | 2        |          |           | 1         |          |
| <i>V. pectenocida</i>     | 2         |                        |          |          |          |          | 1         | 1         |          |
| <i>V. ruber</i>           | 9         |                        |          |          | 1        | 3        | 1         | 4         |          |
| <i>V. tasmaniensis</i>    | 4         |                        |          |          | 1        |          | 3         |           |          |
| <i>V. vulnificus</i> B2   | 1         |                        |          |          |          |          |           | 1         |          |
| <b>Total</b>              | <b>38</b> | <b>0</b>               | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>6</b> | <b>5</b> | <b>11</b> | <b>16</b> | <b>0</b> |

Entre as cepas de víbrios, nenhuma apresentou CIM superior a 128 µg/mL, no entanto as concentrações de 128 e 64 µg/mL foram as que detiveram o maior número de isolados, correspondendo a 73,3% (11) das 15 (quinze) espécies testadas. Esses resultados são similares aos observados nas BHC Gram-negativas, onde essas duas (2) concentrações foram predominantes.

As espécies de víbrios que apresentaram a maior resistência às concentrações de ampicilina com CIM de 128 µg/mL, foram: *V. alginolyticus*, *V. coralliilyticus*, *V. litoralis*, *V. natrigens*, *V. navarrensis*, *V. pectenocida*, *V. ruber* e *V. vulnificus* B2.

Zanetti *et al.* (2001) também detectaram a CIM de AMP > 64 µg/mL, em 88,9% (48) das estirpes de *Vibrio* spp., isoladas de ambientes costeiros na Itália. Este alto perfil de resistência foi relacionado, principalmente, à produção de β-lactamase, observado em 97,9% (47) das estirpes resistentes à AMP.

Contribuindo com a discussão, Ferrini *et al.* (2008) mencionam que entre as 33 (trinta e três) cepas de *Vibrio* spp., procedentes de diferentes fontes (produtos da pesca, frutos do mar, a água do mar e da aquicultura) na Itália, a CIM de AMP variou de 2 a >256 µg/mL.

No Brasil, Rocha (2011) detectou concentrações mínimas para AMP variando de 32 a 256 µg/mL em cepas de *Vibrio* spp., isoladas da água e sedimento do estuário do rio Acaraú (Ceará). Mais da metade dos isolados 53,8% apresentaram CIM de 128 µg/mL de AMP. As espécies com esse perfil de resistência foram: *V. corallilyticus* (8), *V. mimicus* (5) e *V. rumoiensis* (1); e apenas duas (2) espécimes de *V. mimicus* alcançaram a CIM de 256 µg/mL de AMP.

São preocupantes esses níveis elevados de resistência entre estirpes de *Vibrio* ambientais frente a um antimicrobiano de primeira escolha para tratamento de infecções humanas. No Japão, cepas de *V. vulnificus*, isoladas de casos clínicos, apresentaram valores de CIM de AMP  $\leq 4$  µg/mL. Contudo, mesmo com alta susceptibilidade aos antimicrobianos testados, mais de 60% dos pacientes foram a óbito (MATSUMOTO *et al.*, 2010).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A capacidade concentradora de bactérias nos tecidos de ostras foi verificada igualmente tanto para bactérias heterotróficas cultiváveis como para gêneros específicos. Além da maior quantidade, os tecidos das ostras apresentaram a maior diversidade de espécies quando comparado às águas do entorno de onde foram capturadas, o que pode caracterizar uma não especificidade da microbiota que coloniza esses tecidos. Os gêneros bacterianos predominantes foram: *Aeromonas*, *Bacillus* e *Vibrio*. Entre os vírios analisados, *V. alginolyticus*, *V. coralliilyticus* e *V. ruber* foram os mais frequentes.

A ocorrência de chuvas influenciou a densidade de bactérias heterotróficas nas águas, mas esse efeito diluente não foi registrado nos tecidos e líquidos intervalvar das ostras, o que reforça o efeito acumulador desses organismos aquáticos e a estabilidade da sua microbiota frente a variações do ambiente. Entre os parâmetros ambientais analisados (temperatura, pH e salinidade), a salinidade foi o fator que apresentou maior variação no decorrer das coletas.

As populações de bactérias estudadas apresentam um grande risco de disseminação de resistência e multirresistência, visto que mais de dois terço das cepas de BHC e *Vibrio* spp. foram resistentes a pelo menos um (1) antimicrobiano testado, com resistência múltipla em um percentual significativo das populações (58,5% das BHC e 67,6% dos vírios) estando relacionados, em grande parte, à presença de plasmídios.

Cefepima e cefotaxima foram os antimicrobianos, aos quais as cepas Gram-positivas tiveram maiores percentuais de resistências, e entre as Gram-negativas os maiores percentuais de resistências foram a ampicilina e cefalotina. Além disso, elevadas concentrações inibitórias mínimas ( $\geq 64$ ) foram detectados na maioria das cepas multirresistentes.

Ciprofloxacina, cloranfenicol, florfenicol, nitrofurantoína, sulfazotrim e tetraciclina foram os antimicrobianos que apresentaram maior eficiência contra as bactérias Gram-positivas, e frente as Gram-negativas foram florfenicol e gentamicina.

Assim, além da importância dos moluscos bivalves como carreadores de bactérias potencialmente patogênicas para os consumidores, as ostras também podem desempenhar um importante papel como sítio de disseminação de resistência a vários antimicrobianos tanto de uso na clínica médica humana como veterinária.

## REFERÊNCIAS

- ADELEYE, A. *et al.* Antimicrobial susceptibility of potentially pathogenic halophilic *Vibrio* species isolated from seafoods in Lagos, Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 7, n. 20, p. 3791-3794, Oct. 2008.
- ADELEYE, I. A. *et al.* Non-plasmid mediated multi-drug resistance in *Vibrio* and *Aeromonas* sp. isolated from seafoods in Lagos, Nigeria. **Research Journal of Microbiology**, New York, v. 6, n. 2, p. 147-152, 2011.
- ADJEI-BOATENG, D.; AMISAH, S.; QUAGRAINIE, K. K. Bacteriological contamination of the freshwater clam (*Galatea paradoxa*/born 1778) from the Volta estuary, Ghana. **African Journal of Microbiology Research**, Lagos, v. 3, n. 7, p. 396-399, July 2009.
- AGUILAR-MACÍAS, O. L. *et al.* Evaluation of natural and commercial probiotics for improving growth and survival of the pearl oyster, *Pinctada mazatlanica*, during late hatchery and early field culturing. **Journal of the World Aquaculture Society**, Malden, v. 41, n. 3, p. 447-454, June 2010.
- AGUIRRE-GÚZMAN, G.; RUÍZ, H. M.; ASCENCIO, F. A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp. **Aquaculture Research**, Malden, v. 35, n. 15, p. 1395-1404, Dec. 2004.
- AKINBOWALE, O. L.; PENG, H.; BARTON, M. D. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 100, n. 5, p. 1103-1113, May 2006.
- ALAM, M. *et al.* Expression of virulence-related properties by, and intestinal adhesiveness of, *Vibrio mimicus* strains isolated from aquatic environments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 10, p. 3871-3874, Oct. 1996.
- ALLEN, M. J.; EDBERG, S. C.; REASONER, D. J. Heterotrophic plate count bacteria –what is their significance in drink water? **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 92, n. 3, p. 265-274, May 2004.
- ALTERTHUM, F. Mecanismo de ação dos antibacterianos e mecanismo de resistência. *In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia*. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008a. cap. 9, p. 79-85.
- ALTERTHUM, F. Nutrição e metabolismo bacteriano. *In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia*. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. cap. 3, p. 21-29.
- ALTERTHUM, F. Origem e natureza química dos principais agentes antibacterianos. *In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia*. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008b. cap. 8, p. 67-78.
- ALVARENGA, L.; NALESSO, R. C. Preliminary assessment of the potential for mangrove oyster cultivation in Piraquê-açu river estuary (Aracruz, ES). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, n. 1, p. 163-169, Jan. 2006.

- AMARAL, V. S. **Estudo morfológico comparativo de espécies do gênero *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) do Atlântico oeste**. 2010. 123 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia, na Área de Malacologia) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- AMARO, C.; BIOSCA, E. G. *Vibrio vulnificus* biotype 2, pathogenic for eels, is also an opportunistic pathogen for humans. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 4, p. 1454-1457, Apr. 1996.
- AMIRMOZAFARI, N.; FOROHESH, H.; HALAKOO, A. Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of Golestan province in Iran. **Archives of Razi Institute**, Karaj, v. 60, n. 1, p. 33-44, Apr. 2005.
- ANSARI, M.; RAHIMI, E.; RAISSY, M. Antibiotic susceptibility and resistance of *Aeromonas* spp. isolated from fish. **African Journal of Microbiology Research**, Lagos, v. 5, n. 31, p. 5772-5775, Dec. 2011.
- ANSARI, M.; RAISSY, M. In vitro susceptibility of commonly used antibiotics against *Vibrio* spp. isolated from Lobster (*Panulirus homarus*). **African Journal of Microbiology Research**, Lagos, v. 4, n. 23, p. 2629-2631, Dec. 2010.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Detecção e identificação de bactérias de importância médica. Módulo V. ANVISA: Brasília. 2004. 93 p.
- ARCHER, R. M. B.; MORETTO, E. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em mexilhões (*Perna perna*, Linnaeus, 1758) de banco natural do litoral do município de Palhoça, Santa Catarina, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 3, p. 379-386, set. 1994.
- AUSTIN, B.; ZHANG, X. H. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. **Letters in Applied Microbiology**, Malden, v. 43, n. 2 p. 119-124, Aug. 2006.
- BAFFONEA, W.; CITTERIOA, B.; VITTORIAA, E.; CASAROLIA, A.; CAMPANAA, R.; FALZANO, L.; DONELLIB, G. Retention of virulence in viable but non-culturable halophilic *Vibrio* spp. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 89, n. 1, p. 31-39, Dec. 2003.
- BAPTISTA, P.; VENÂNCIO, A. Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos. 1. ed. Guimarães: Forvisão, 2003. 125 p.
- BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J.-L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 19, n. 3, p. 260-265, June 2008.
- BELENEVA, I. A. *et al.* Taxonomic composition of bacteria associated with cultivated mollusks *Crassostrea lugubris* and *Perna viridis* and with the water of the Gulf of Nha Trang Lagoon, Vietnam. **Microbiology**, New York, v. 76, n. 2, p. 253-262, Apr. 2007.

BEN-HAIM, Y. *et al.* *Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 53, n. 1, p. 309-315, Jan. 2003.

BERNARDES, M. V. S. *et al.* Avaliação de três diferentes sanitizantes em viveiros de piscicultura pela contagem de bactérias do gênero *Aeromonas*. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 4, n. 1, p. 69-83, jan./jun. 2003.

BISHARAT, N. *et al.* Serological and molecular characteristics of *Vibrio vulnificus* biotype 3: evidence for high clonality. **Microbiology**, New York, v. 153, n. 3, p. 847-856, Mar. 2007.

BISHTI, S. *et al.* Biodegradation of naphthalene and anthracene by chemo-tactically active rhizobacteria of *Populus deltoides*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 4, p. 922-930, Oct./Dec. 2010.

BLACK, J. G. Terapia antimicrobiana unidade V: interações hospedeiro-micróbio. *In:* \_\_\_\_\_. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas**. 4<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. cap. 13, p. 316-347.

BOETTCHER, K. J.; RUBI, E. G. Depressed light emission by symbiotic *Vibrio fischeri* of the sepiolid squid *Euprymna scolopes*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 172, n. 7, p. 3701-3706, July 1990.

BRAIN, R. A. *et al.* Aquatic plants exposed to pharmaceuticals: effects and risks. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 192, p. 67-115, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa MA nº 42, de 20 de dezembro de 1999. Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal - PNCR, e os Programas de Controle de Resíduos em Carne - PCRC, Mel - PCRM, Leite - PCRL e Pescado - PCRP. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 22 dez. 1999. Seção 1, p. 213.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 9, de 9 de julho de 2009. Proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol e nitrofurano. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 jul. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 26, de 27 de junho de 2003. Aprovar o regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário, na forma dos anexos a presente instrução normativa. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 de jul. 2003. Seção 1, p. 4.

BRITO, L. **Efeito da salinidade sobre o crescimento da ostra nativa *Crassostrea* sp como subsídio ao desenvolvimento da maricultura de espécies nativas em mar aberto**. 2008. 46 f. Dissertação (Mestrado em Sistemas Costeiro e Oceânico) – Centro de Estudos do Mar, Universidade Federal do Paraná, Pontal do Paraná, 2008.

BROWN, M. G.; BALKWILL, D. L. Antibiotic resistance in bacteria isolated from the deep terrestrial subsurface. **Microbial Ecology**, New York, v. 57, n. 3, p. 484-93, Apr. 2009.

BULLER, N. B. Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual. Oxfordshire: CABI Publishing, 2004. 361 p.

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

CAMPA-CÓRDOVA, A. I. *et al.* Effects of chloramphenicol, erythromycin, and furazolidone on growth of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros gracilis*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 260, n. 1-4, p. 145-150, Sept. 2006.

CAMPA-CÓRDOVA, A. I. *et al.* Growth, survival, and superoxide dismutase activity in juvenile *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) treated with probiotics. **Hidrobiológica**, Mexico City, v. 19, n. 2, p. 151-157, Aug. 2009.

CAMPOS, C. L.; FERREIRA, E. O. *Vibrio cholerae*. In: **TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. cap. 45, p. 347-354.

CAMPOS, E. *et al.* *Vibrio mimicus* diarrhea following ingestion of raw turtle eggs. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 4, p. 1141-1144, Apr. 1996.

CAÑIGRAL, I. *et al.* Detection of *Vibrio vulnificus* in seafood, seawater and wastewater samples from a Mediterranean coastal área. **Microbiological Research**, Jena, v. 165, n. 8, p. 657-664, Oct. 2010.

CAO, J. *et al.* Rapid detection of *Vibrio metschnikovii* in aquatic products by real-time PCR. **Folia Microbiologica**, Dordrecht, v. 55, n. 6, p. 607-613, Nov. 2010.

CARPENTER, C. E.; BROADBENT, J. R. External concentration of organic acid anions and pH: key independent variables for studying how organic acids inhibit growth of bacteria in mildly acidic foods. **Journal of Food Science**, Malden, v. 74, n. 1, p. 12-5, Jan./Feb. 2009.

CARVALHO, E. M. R. **Quantificação e identificação de vibrio spp. na hemolinfa de camarões *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) cultivados em fazendas no Estado do Ceará**. 2009. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

CASTRO, B. M. *et al.* O mar de amanhã, com as mudanças climáticas de hoje. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 62, n. 3, p. 40-42, jul./set. 2010.

CAVALLO, R. A.; ACQUAVIVA, M. I.; STABILI, L. Culturable heterotrophic bacteria in seawater and *Mytilus galloprovincialis* from a Mediterranean area (Northern Ionian Sea – Italy). **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 149, n. 1-4, p. 465-475, Feb. 2009.

CFSAN – Centre for Food Safety and Applied Nutrition. National Shellfish Sanitation Program. Guide for the control of molluscan shellfish, 357-359. 2003.

CHAKRABORTY, R. D.; SURENDRAN, P. K.; CHAKRABORTY, K. Antibiotic resistance and plasmid profiling of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from shrimp farms along the

southwest coast of India. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 25, n. 11, p. 2005-2012, Nov. 2009.

CHANGA, H.-C. *et al.* Molecular characterizations of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolated from Southern Taiwan oyster-growing environment. **Food Control**, Oxford, v. 22, n. 2, p. 245-251, Feb. 2011.

CHAO, G. *et al.* Distribution, prevalence, molecular typing, and virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from different sources in coastal province Jiangsu, China. **Food Control**, Oxford, v. 20, n. 10, p. 907-912, Oct. 2009.

CHATZIDAKI-LIVANIS, M. *et al.* Genetic distinctions among clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 9, p. 6136-6141, Sept. 2006.

CHEN, W. *et al.* Development of a single base extension-tag microarray for the detection of pathogenic *Vibrio* species in seafood. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 89, n. 6, p. 1979-1990, Mar. 2011.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement: Supplement M100-S20, Wayne, PA, USA, 2010.

COLWELL, R. R. A global and historical perspectives of the Genus *Vibrio*. In: THOMPSON, F.L.; AUSTIN, B.; SWINGS, J. First International Conference on the Biology of Vibrios. **Journals America Society for Microbiology**, Washington, v. 188, n. 13, p. 4592-4596, July 2006.

CONTER, M. *et al.* Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 128, n. 3, p. 497-500, Jan. 2009.

COSTA, R. A. *et al.* Quantification and distribution of *Vibrio* species in water from an estuary in Ceará-Brazil impacted by shrimp farming. **Brazilian Journal of Oceanography**, São Paulo, v. 58, n. 3, p. 183-188, July/Sept. 2010.

COSTA, R. A. *et al.* Susceptibilidade “in vitro” a antimicrobianos de estirpes de *Vibrio* spp isoladas de camarões (*Litopenaeus vannamei*) e de água de criação destes animais provenientes de uma fazenda de camarões no Ceara – Nota previa. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 45, n. 6, p. 458-462, nov./dez. 2006.

CRUZ-ROMERO, M.; KERRY, J. P.; KELLY, A. L. Changes in the microbiological and physicochemical quality of high-pressure-treated oysters (*Crassostrea gigas*) during chilled storage. **Food Control**, Oxford, v. 19, n. 12, p. 1139-1147, Dec. 2008.

CUNHA-SANTINO, B. M.; SCIESSERE, L.; BIANCHINI JÚNIOR, I. As atividades das enzimas na decomposição da matéria orgânica particulada em ambientes aquáticos continentais. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 1, p. 30-41, jan./mar. 2008.

- DALSGAARD, A. The occurrence of human pathogenic *Vibrio* spp. and *Salmonella* in aquaculture. **International Journal of Food Science e Technology**, Malden, v. 33, n. 2, p. 127-138, Apr. 1998.
- DANG, H. *et al.* Dominant chloramphenicol-resistant bacteria and resistance genes in coastal marine waters of Jiaozhou Bay, China. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 24, n. 2, p. 209-217, Feb. 2008.
- DANG, H. Y. *et al.* Molecular characterizations of oxytetracycline resistant bacteria and their resistance genes from mariculture waters of China. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 52, n. 11, p. 1494-1503, Nov. 2006.
- DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 74, n. 3, p. 417-433, Sept. 2010.
- DAVIS, B. R. *et al.* Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholerae* and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 14, n. 6, p. 631-639, Dec. 1981.
- DEFOIRDT, T.; SORGELOOS, P.; BOSSIER, P. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. **Current Opinion in Microbiology**, Dordrecht, v. 14, n. 3, p. 251-258, June 2011.
- DEPIZZOL, F. **Avaliação da resistência a antibióticos em isolados de *Escherichia coli* provenientes de esgoto hospitalar e sanitário**. 2006. 143 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Centro Tecnológico, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2006.
- DIKOW, R. B. Systematic relationships within the Vibrionaceae (Bacteria: Gammaproteobacteria): steps toward a phylogenetic taxonomy. **Cladistics**, Malden, v. 27, n. 1, p. 9-28, Feb. 2011.
- DONOVAN, T. J.; NETTEN, P. Culture media for the isolation and enumeration of pathogenic *Vibrio* species in foods and environmental samples. **International Journal of Food Microbiology**, London, v. 26, n. 1, p. 77-91, June 1995.
- DOWNES, M. P.; ITO, K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4<sup>th</sup> ed., Washington: Ed. APHA, 2001. p. 676.
- DSMZ. DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN. **Search in Bacterial Nomenclature Up-to-Date database (in total 2117 genera)**. Disponível em: <[http://old.dsmz.de/microorganisms/bacterial\\_nomenclature\\_info.php?genus=Vibrio](http://old.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature_info.php?genus=Vibrio)>. Acesso em 24 mar. 2012.
- DUMONT, I. *et al.* Bacterial abundance and production in epipelagic and mesopelagic waters in the Subantarctic and Polar Front zones south of Tasmania. **Deep-Sea Research II-Topical Studies in Oceanography**, Oxford, v. 58, n. 21-22, p. 2212-2221, Nov. 2011.

DUMONTET, S. *et al.* Prevalence and diversity of *Aeromonas* and *Vibrio* spp. in coastal waters of Southern Italy. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 23, p. 53-72, Jan. 2000.

EDENS, F. W. An alternative for antibiotic use in poultry: probiotics. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 5, n. 2, p. 75-79, May/Aug. 2003.

EDUOK, S. I. *et al.* Bacteriological and polycyclic aromatic hydrocarbon accumulation in mangrove oyster (*Crassostrea tulipa*) from Douglas creek, Nigeria. **Pakistan Journal Nutrition**, Faisalabad, v. 9, n. 1, p. 35-42, Jan. 2010.

EFSA – European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the increased mortality events in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. **EFSA Journal**, Parma, v. 8, n. 11. Nov. 2010. 60 p.

EILER, A.; JOHANSSON, M.; BERTILSSON, S. Environmental influences on *Vibrio* populations in northern temperate and Boreal Coastal Waters (Baltic and Skagerrak Seas). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 9, p. 6004-6011, Sept. 2006.

ELLIOT, E. L. *et al.* *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and other *Vibrio* spp. In: Food and Drug Administration – FDA, Bacteriological Analytical Manual. FDA, Center for Food Safety and Applied Nutrition – CFSAN, 2001.

EMBAREK, P. K. B. Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 23, n. 1, p. 17-34. Sept. 1994.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S. *et al.* Characterization of *Aeromonas* species isolated from an estuarine environment. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 2, p. 452-460, Apr./June 2010.

EVANS, C. *et al.* Potential climate change impacts on microbial distribution and carbon cycling in the Australian Southern Ocean. **Deep-Sea Research II-Topical Studies in Oceanography**, Oxford v. 58, n. 21-22, p. 2150-2161, Nov. 2011.

FAKRUDDIN, M. *et al.* Anti-bacterial activity of the extract of *Terminalia arjuna* against multi antibiotic resistant *Vibrio cholerae*. **Journal of Scientific Research**, Bangladesh, v. 3, n. 1, p. 129-137, Jan. 2011.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. The state of world fisheries and aquaculture 2008. In: **FAO Fisheries and Aquaculture Department**. Rome, 2009. 176 p.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. The state of world fisheries and aquaculture 2010. In: **FAO Fisheries and Aquaculture Department**. Rome, 2010. 197 p.

FAO. © 2005-2011. National Aquaculture Sector Overview. Brazil. National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets. **Text by Suplicy, F.M.** In: FAO Fisheries and Aquaculture

Department [online]. Rome. Updated 1 June 2004. [Cited 7 October 2011]. Disponível em: <[http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso\\_brazil/en](http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_brazil/en)>. Acesso em: 29 out. 2011.

FARMER III, J. J. *et al.* Genus 1. *Vibrio* Pacini 1894, 411AL. In: Bergery's Manual of Systematic Bacteriology, 2<sup>nd</sup> ed., v. 2. The Proteobacteria part B the Gammaproteobacteria. BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. (eds.). p. 494-546, 2005.

FARRAPEIRA, C. M. R. *et al.* Coliform accumulation in *Amphibalanus amphitrite* (Darwin, 1854) (Cirripedia) and its use as an organic pollution bioindicator in the estuarine area of Recife, Pernambuco, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 70, n. 2, p. 301-309, May 2010.

FARTO, R. *et al.* Purification and partial characterisation of a fish lethal extracellular protease from *Vibrio pelagius*. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 89, p.181-94, Oct. 2002.

FDA – Food and Drug Administration. Guide for the control of molluscan shellfish. **In: FDA National Shellfish Sanitation Program**. Washington, p. 401-404. 2009.

FERNANDEZ-DELGADO, M.; SUAREZ, P. Multiple antibiotic resistances of enteric bacteria isolated from recreational coastal waters and oysters of the Caribbean Sea. **Annals of Microbiology**, New York, v. 59, n. 3, p. 409-414, Sept. 2009.

FERNÁNDEZ-REIRIZ, M. J.; NAVARRO, J. M.; LABARTA, U. Enzymatic and feeding behaviour of *Argopecten purpuratus* under variation in salinity and food supply. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 141, n. 2, p. 153-163, June 2005.

FERRINI, A. M. *et al.* Evaluation of antibacterial resistance in *Vibrio* strains isolated from imported seafood and Italian aquaculture settings. **Food Analytical Methods**, New York, v. 1, n. 3, p. 164–170, Sept. 2008.

FIGUEIRÊDO, M. C. B. *et al.* Impactos ambientais da carcinicultura de águas interiores. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 3, p. 231-240, jul./set. 2006.

FONSECA, A. L. **Antibióticos na Clínica Diária**. 4<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: EPUME, 1991. p. 514.

FOUZ, B. *et al.* Susceptibility of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to vibriosis due to *Vibrio vulnificus* biotype 2 serovar E. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 212, n. 1-4, p. 21-30. Sept. 2002.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p.

FRIEDRICH, M. *et al.* Effect of model sorptive phases on phenanthrene biodegradation: molecular analysis of enrichments and isolates suggests selection based on bioavailability. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n.7, p. 2703-2710, July 2000.

- GALL, S. L.; HASSEN, M. B.; GALL, P. L. Ingestion of a bacterivorous ciliate by the oyster *Crassostrea gigas*: protozoa as a trophic link between picoplankton and benthic suspension-feeders. **Marine Ecology Progress Series**, Oldendorf Luhe, v. 152, p. 301-306, June 1997.
- GAO, P. *et al.* Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment. **Water Research**, Oxford, p. 1-10, Feb. 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135412000929>>. Acesso em: 26 fev. 2012.
- GHOSH, K.; MANDAL, S. Antibiotic resistant bacteria in consumable fishes from Digha coast, west Bengal, India. **Proceedings of the Zoological Society**, Kolkata, v. 63, n. 1, p. 13-20, June 2010.
- GIBSON, L. F.; WOODWORTH, J.; GEORGE, A. M. Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 169, n. 1-2, p. 111-120, Nov. 1998.
- GIRLICH, D.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Diversity of clavulanic acid-inhibited extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Aeromonas* spp. from the Seine river, Paris, France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 55, n. 3, p. 1256-1261, Mar. 2011.
- GONDIM, S. G. *et al.* Diagnóstico da agricultura irrigada no baixo e médio Jaguaribe. **Revista Econômica do Nordeste**, Fortaleza, v. 35, n. 3, p. 424-430, jul./set. 2004.
- GONZALEZ-ACOSTA, B. *et al.* Seasonal seawater temperature as the major determinant for populations of culturable bacteria in the sediments of an intact mangrove in an arid region. **FEMS Microbiology Ecology**, Malden, v. 55, n. 2, p. 311-321, Feb. 2006.
- GRAEVENITZ, A. V.; BERNARD, K. The Genus *Corynebacterium* – Medical. *In: DWORKIN, M. et al. The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria*. 3<sup>rd</sup> ed, New York: Springer, 2006. v. 3, chap. 1.1.16, p. 819-842.
- GROHMANN, E.; MUTH, G.; ESPINOSA, M. Conjugative plasmid transfer in Gram-positive Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 67, n. 2, p. 277-301, June 2003.
- GUAN, L.; CHO, K. H.; LEE, J.-H. Analysis of the cultivable bacterial community in jeotgal, a Korean salted and fermented seafood, and identification of its dominant bacteria. **Food Microbiology**, London, p. 28, n. 1, p. 101-113, Feb. 2011.
- GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 667-679, Feb. 2010.
- GUIMARÃES, I. M. *et al.* Influência da salinidade sobre a sobrevivência da ostra-do-mangue, *Crassostrea rhizophorae*. **Arquivos de Ciências do Mar**, Fortaleza, v. 41, n. 1, p. 118-22, jan./jun. 2008.

GUISANDE, J. A. *et al.* Genotypic diversity of culturable *Vibrio* species associated with the culture of oysters and clams in Galicia and screening of their pathogenic potential. **Journal of Shellfish Research**, Groton, v. 27, n. 4, p. 801-809, Aug. 2008.

HALDAR, S.; MODY, K. H.; JHA, B. Abundance, diversity and antibiotics resistance pattern of *Vibrio* spp. in coral ecosystem of Kurusadai island. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 51, n. 2, p. 153-162, Apr. 2011.

HAN, F. *et al.* Antimicrobial susceptibilities of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* isolates from Louisiana Gulf and retail raw oysters. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 21, p. 7096-7098, Nov. 2007.

HARNISZ, M.; GOŁAŚ, I.; PIETRUK, M. Tetracycline-resistant bacteria as indicators of antimicrobial resistance in protected waters—The example of the Drwęca River Nature Reserve (Poland). **Ecological Indicators**, Amsterdam, v. 11, n. 2, p. 663-668, Mar. 2011.

HASAN, N. A. *et al.* Comparative genomics of clinical and environmental *Vibrio mimicus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Danvers, v. 107, n. 49, p. 21134-21139, Dec. 2010.

HASEGAWA, H. *et al.* Virulence of metalloproteases produced by *Vibrio* species on Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf Luhe, v. 85, n. 2, p. 123-131, June 2009.

HATHA, A. A. M. *et al.* Bacteriology of the fresh water bivalve clam *Batissa violacea* (Kai) sold in the Suva market. **The South Pacific Journal of Natural Science**, Suva, v. 23, p. 48-50, Dec. 2005.

HAYASHI, K. *et al.* *Vibrio superstes* sp nov., isolated from the gut of Australian abalones *Haliotis laevigata* and *Haliotis rubra*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 53, n. 6, p. 1813-1817, Nov. 2003.

HEARST, R. *et al.* An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, Macclesfield, v. 15, n. 1, p. 5-7, Feb. 2009.

HELM, M. M.; BOURNE, N.; LOVATELLI, A. Hatchery culture of bivalves: a practical manual. FAO Fisheries Technical Paper, n. 471, p. 1-177, 2004.

HENRIQUES, I. S. *et al.* Occurrence and diversity of integrons and  $\beta$ -lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 157, n. 10, p. 938-947, Dec. 2006.

HIGGINS, P. G. *et al.* OXA-58, a novel class D  $\beta$ -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 49, n. 1, p. 202-208, Sept. 2005.

HOFFMANN, F. L. Fatores limitantes à proliferação de microorganismos em alimentos. **Brasil Alimentos**, São José do Rio Preto, n. 9, p. 23-30, July/Aug. 2001.

HOLMSTRÖM, K. *et al.* Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. **International Journal of Food Science and Technology**, Malden, v. 38, n. 3, p. 255-266, Mar. 2003.

HUANGA, J.-J. *et al.* Monitoring and evaluation of antibiotic-resistant bacteria at a municipal wastewater treatment plant in China. **Environment International**, Oxford, p. 1-6, Mar. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412011000511>>. Acesso em 28 fev. 2012.

IGBINOSA, E. O.; OBI, C.L.; OKOH, A. I. Occurrence of potentially pathogenic vibrios in the final effluents of a wastewater treatment facility in a rural community of the Eastern Cape Province of South Africa. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 160, n. 8, p. 531-537, Oct. 2009.

IGBINOSA, E. O.; OBI, C.L.; OKOH, A. I. Seasonal abundance and distribution of *Vibrio* species in the treated effluents of wastewater treatment facilities in suburban and urban communities of Eastern Cape Province, South Africa. **The Journal of Microbiology**, Seoul, v. 49, n. 2, p. 224-232, Apr. 2011.

IGBINOSA, E.O.; OKOH, A. O. Emerging *Vibrio* species: an unending threat to public health in developing countries. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 159, n. 7-8, p. 495-506, Oct. 2008.

IGNACIO, B. L. *et al.* Genetic evidence for the presence of two species of *Crassostrea* Bivalvia: Ostreidae on the coast of Brazil. **Marine Biology**, London, v. 136, n. 6, p. 987-991, July 2000.

INDU, M. N. *et al.* Antimicrobial activity of some of the south-Indian spices against serotypes of *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 153-158, Apr./June 2006.

INTERAMINENSE, J. A. *et al.* Recovery and screening for antibiotic susceptibility of potential bacterial pathogens from the oral cavity of shark species involved in attacks on humans in Recife, Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, Berks, v. 59, n. 8, p. 941-947, Aug. 2010.

ISMAIL, H. *et al.* Genetic characterization of multidrug-resistant, extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Vibrio cholerae* O1 outbreak strains, Mpumalanga, South Africa, 2008. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 49, n. 8, p. 2976-2979, Aug. 2011.

ITTOOP, G. *et al.* Modulation of selected hemolymph factors in the Indian edible oyster *Crassostrea madrasensis* (Preston) upon challenge by *Vibrio alginolyticus*. **Indian Journal of Fisheries**, Kerala, v. 57, n. 2, p. 55-60, Nov. 2010.

JOHNSTON, P.; SANTILLO, D. Chemical usage in aquaculture: implications for residues in market products. Greenpeace Research Laboratories, Department of Biological Sciences, University of Exeter EX4 4PS, UK. 2002. 15p.

- JUN, W. J. *et al.* Isolation, molecular characterization, and antibiotic susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* in Korean seafood. **Foodborne Pathogens and Disease**, New Rochelle, v. 9, n. 3, p. 1-8, Mar. 2012.
- KARIATSUMARI, S. N.; SILVA, C. Microbiologia. Suzano: Centro educacional técnico Suzanense – CETÉS. 2008. 69 p. Disponível em: <<http://www.cetes.com.br/professor/claudio/microbiologia.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2009.
- KIM, H.-J. *et al.* Effects of combined treatment of sodium hypochlorite/ionizing radiation and addition of vitamin B<sub>1</sub> on microbial flora of oyster and short-necked clam. **Foodborne Pathogens and Disease**, New Rochelle, v. 8, n. 7, p. 825-830, June 2011.
- KIM, J. H. *et al.* Occurrence and antibiotic resistance of *Vibrio vulnificus* in seafood and environmental waters in Korea. **Journal of Food Safety**, Malden, v. 31, n. 4, p. 518-524, Nov. 2011.
- KIROV, M. S. The public health significance of *Aeromonas* spp. in foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 20, n. 4, p. 179-198, Dec. 1993.
- KITIYODOM, S. *et al.* Characterization of antibiotic resistance in *Vibrio* spp. isolated from farmed marine shrimps (*Penaeus monodon*). **FEMS Microbiology Ecology**, Malden, v. 72, n. 2, p. 219-227, May 2010.
- KOLM, H. E.; ABSHER, T. M. Bacterial density and coliform organisms in waters and oysters of Paranaguá estuarine complex, Paraná, Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 49-59, Jan./Feb. 2008.
- KOLM, H. E.; ABSHER, T. M. Spatial and temporal variability of saprophytic bacteria in the surface waters of Paranaguá and Antonina Bays, Paraná, Brazil. **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 308, n. 3, 197-206, 1995.
- KONEMAN, E. *et al.* **Color Atlas and textbook of Diagnostic microbiology**. 6<sup>th</sup>. ed. Washington: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. 1535p.
- KRUMPERMAN, P. H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 46, n. 1, p. 165-170, July 1983.
- KUEH, C. S. W.; CHAN, K.-Y. Bacteria in bivalve shellfish with special reference to the oyster. **Journal of Applied Bacteriology**, Malden, v. 59, n. 1, p. 41-47, July 1985.
- LAFISCA, A. *et al.* Enzymatic characterization of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from bivalves harvested at Venice Lagoon (Italy) and Guanabara Bay (Brazil). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 50, n. 4, p. 199-202, Aug. 2008.
- LAGANÀ, P. *et al.* Susceptibility to antibiotics of *Vibrio* spp. and *Photobacterium damsela* ssp. piscicida strains isolated from Italian aquaculture farms. **New Microbiologica**, Via Riviera, v. 34, n. 1, p. 53-63, Jan. 2011.

- LAGO, P. E.; NIETO, T. P.; SEGUÍN, R. F. Fast detection of *Vibrio* species potentially pathogenic for mollusc. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 139, n. 3-4, p. 339-346, Nov. 2009.
- LAI, H.-T. *et al.* Effects of chloramphenicol, florfenicol, and thiamphenicol on growth of algae *Chlorella pyrenoidosa*, *Isochrysis galbana*, and *Tetraselmis chui*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 72, n. 2, p. 329-334, Apr. 2009.
- LAI, Z.-F. *et al.* Virulence and drug resistance of foodborne *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Tropical Medicine**, Beijing, v. 9, n. 8, p. 882-883, Aug. 2009.
- LAMBERT, C. *et al.* *Vibrio pectenica* sp. nov., a pathogen of scallop (*Pecten maximus*) larvae. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 48, n. 2, p. 481-487, Apr. 1998.
- LANG, K.S. *et al.* Novel florfenicol and chloramphenicol resistance gene discovered in Alaskan soil by using functional metagenomics. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 15, p. 5321-5326, Aug. 2010.
- LAZOSKI, C. *et al.* Phylogeny and phylogeography of Atlantic oyster species: evolutionary history, limited genetic connectivity and isolation by distance. **Marine Ecology Progress Series**, Oldendorf Luhe, v. 426, p. 197-212, Mar. 2011.
- LEE, J. V.; DONOVAN, T. J.; FURNISS, A. L. Characterization, taxonomy, and emended description of *Vibrio metschnikovii*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 28, n. 1, p. 99-111, Jan. 1978.
- LEE, R. J.; YOUNGER, A. D. Developing microbiological risk assessment for shellfish depuration. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Oxford v. 50, p. 177-183, Oct. 2002.
- LEGAT, A. P. *et al.* **Caracterização genética de ostras nativas do gênero *Crassostrea* no Brasil: base para o estabelecimento de um programa nacional de melhoramento.** Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2009. 21p.
- LELLIOTT, R. A.; STEAD, D. E. Methods for the diagnosis of bacterial plant disease. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 216, Apr. 1987.
- LENZ, T.; BOEHS, G. Ciclo reproductivo del ostión de manglar *Crassostrea rhizophorae* (Bivalvia: Ostreidae) en la Bahía de Camamu, Bahia, Brasil. **Revista de biologia tropical**, São José, v.59, n.1, p. 137-149, Mar. 2011.
- LEVY, C. E. *et al.* Manual de Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Hospitalar - Módulo III. Brasília: ANVISA, 2000. p. 152.
- LI, D. *et al.* Antibiotic-resistance profile in environmental bacteria isolated from penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river. **Environmental Microbiology**, Malden, v. 11, n. 6, p. 1506-1517, June 2009.

LIBRELATO, F. R.; LOPES-SHIKIDA, S. A. R. Segurança alimentar: um estudo multidisciplinar da qualidade do filé de tilápia comercializado no município de Toledo-PR. **Informe Gepec**, Cascavel, PR, v. 9, n. 2, p. 27-50, jul. 2005.

LIMA, R. M. S. *et al.* Resistencia a antimicrobianos de bacterias oriundas de ambiente de criação e files de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 1, p. 126-132, jan./fev. 2005.

LIN, C.-S. *et al.* Histamine contents of salted seafood products in Taiwan and isolation of halotolerant histamine-forming bacteria. **Food Chemistry**, Oxford, v. 131, n. 2, p. 574-579, Mar. 2012.

LIN, Y.-R. *et al.* Characterization of a new phage, termed  $\phi$ A318, which is specific for *Vibrio alginolyticus*. **Archives of Virology**, [Wien], p. 1-10, Feb. 2012. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/p18077jn4jr20681/>>. Acesso em: 10 mar. 2012.

LINDE, H. J. *et al.* *Vibrio metschnikovii*, a rare cause of wound infection. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 10, p. 4909-4911, Oct. 2004.

LINDSTRÖM, E. S.; AGTERVELD, M. P. K.-V.; ZWART, G. Distribution of typical freshwater bacterial groups is associated with pH, temperature, and lake water retention time. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 12, p. 8201-8206, Dec. 2005.

LIPP, E. K.; RODRIGUEZ-PALACIOS, C.; ROSE, J. B. Occurrence and distribution of the human pathogen *Vibrio vulnificus* in a subtropical Gulf of Mexico estuary. **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 460, n. 1-3, p. 165-173, Sept. 2001.

LIU, F. *et al.* Pulsed-field gel electrophoresis typing of multidrug-resistant *Vibrio parahaemolyticus* isolated from various sources of seafood. **Journal of Health Science**, Tokyo, v. 55, n. 5, p. 783-789, July 2009.

LIVERMORE, D. M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clinical Infectious Diseases**, Cary, v. 34, n. 5, p. 634-40, Mar. 2002.

LOPEZ-JOVEN, C.; ROQUE, A.; OLIVER, J. D. Survival Kinetics of Two Genotypes of *Vibrio vulnificus* in Oysters (*Crassostrea virginica*) Stored at Two Different Temperatures. 7th International Conference on Molluscan Shellfish Safety, Nantes, France. 2009. p. 5.

LUIS-VILLASEÑOR, I. E. *et al.* Beneficial effects of four Bacillus strains on the larval cultivation of *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 321, n. 1-2, p. 136-144, Nov. 2011.

LYONS, M. M. *et al.* Characteristics of marine aggregates in shallow-water ecosystems: implications for disease ecology. **Ecohealth**, New York, v. 4, n. 4, p. 406-420, Dec. 2007.

MADIGAN, M. T. *et al.* Crescimento microbiano. In: \_\_\_\_\_. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010a. cap. 6, p. 142-174.

MADIGAN, M. T. *et al.* Tratamento da água de rejeitos, purificação da água e doenças microbianas transmitidas pela água. *In: \_\_\_\_\_*. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010b. cap. 36, p. 1025-1042.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Controle de crescimento microbiano. *In: \_\_\_\_\_*. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004. cap 17, p. 523-553.

MANIVASAGAN, P. *et al.* Antibiotic resistance and plasmid profiles of *Vibrio* isolates from muthupettai mangrove environment, southeast coast of India. **Journal of International Dental and Medical Research**, Worthing, v. 3, n. 1, p. 38-44, Feb. 2010.

MARCHAND PAJARES, E. O. **Microorganismos indicadores de la calidad del agua de consumo humano en Lima Metropolitana**. 2002. 70 f. Monografía (Graduación en Biología con mención en microbiología y parasitología) – Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, 2002.

MARINS, R. V.; PAULA FILHO, F. J.; ROCHA, C. A. S. Geoquímica de fósforo como indicadora da qualidade ambiental e dos processos estuarinos do rio Jaguaribe - costa nordeste oriental brasileira. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1208-1214, ano 2007.

MARTINEZ, M. B.; TRABULSI, L. R. *Corynebacterium diphtheriae* e outras espécies do gênero. *In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.* **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008a. cap. 28, p. 231-235.

MARTINEZ, M. B.; TRABULSI, L. R. Enterobacteriaceae. *In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.* **Microbiologia**. (eds.). 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008b. cap. 35, p. 271-279.

MARUO, K. *et al.* Involvement of bradykinin generation in intravascular dissemination of *Vibrio vulnificus* and prevention of invasion by a bradykinin antagonist. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, n. 2, p. 866-869, Feb. 1998.

MATSUMOTO, K. *et al.* Clinical features of *Vibrio vulnificus* infections in the coastal areas of the Ariake Sea, Japan. **Journal of Infection and Chemotherapy**, Tokyo, v. 16, n. 4, p. 272-279, Aug. 2010.

MATTÉ, M. H. *et al.* Virulence factors of *Vibrio metschnikovii* strains isolated from fish in Brazil. **Food Control**, Oxford, v. 18, n. 6, p. 747-751, June 2007.

MATYAR, F. *et al.* *Aeromonas* and *Pseudomonas*: antibiotic and heavy metal resistance species from Iskenderun Bay, Turkey (northeast Mediterranean Sea). **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 167, n. 1-4, p. 309-320, Aug. 2010.

MATYAR, F.; KAYA, A.; DINÇER, S. Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 407, n. 1, p. 279-285, Dec. 2008.

MAZOUNI, N. Influence of suspended oyster cultures on nitrogen regeneration in a coastal lagoon (Thau, France). **Marine Ecology Progress Series**, Oldendorf Luhe, v. 276, p. 103-113, Aug. 2004.

MCEWEN, S. A.; FEDORKA-CRAY, P. J. Antimicrobial use and resistance in animals. **Clinical Infectious Diseases**, Cary, v. 3, n. 3, p. 95-106, June 2002.

MCKINNON, A. D. *et al.* Seacage aquaculture in a world heritage area: the environmental footprint of a barramundi farm in tropical Australia. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 60, n. 9, p. 1489-1501, Sept. 2010.

MCLAUGHLIN, J. B. *et al.* Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters. **The New England Journal Medicine**, Boston, v. 353, n. 14, p. 1463-1470, Oct. 2005.

MECHRI, B. *et al.* Diversity of Vibrionaceae associated with *Ruditapes decussatus* hatchery in Tunisia. **Annals of Microbiology**, New York, p. 1-10, June 2011.

MEJDI, S. *et al.* Biochemical characteristics and genetic diversity of *Vibrio* spp. and *Aeromonas hydrophila* strains isolated from the Lac of Bizerte (Tunisia). **World Journal Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 26, p. 2037-2046, Apr. 2010.

MEJDI, S. *et al.* Phenotypic characterization and enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (eric-pcr) of *Aeromonas* spp. and *Vibrio* spp. strains isolated from *Sparus aurata* fish farm (Khenis, Tunisia). **African Journal of Microbiology Research**, Lagos, v. 5, n. 19, p. 2920-2928, Sept. 2011.

MELO, A. G. C. *et al.* Molecular identification, phylogeny and geographic distribution of Brazilian mangrove oysters (*Crassostrea*). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 3, p. 564-572, Apr. 2010

MELO, L. M. R. *et al.* Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from pond-reared *Litopenaeus vannamei* marketed in Natal, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, Sao Paulo v. 42, n. 4, p. 1463-1469, Oct./Dec. 2011.

MENDES, E. S. *et al.* *Vibrio* spp. isolados de camarão e água de cultivo de fazenda marinha em Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 10, n. 4, p. 1191-1199. out./dez. 2009.

MENDES, R. E. *et al.* Characterization of an integron carrying blaIMP-1 and a new aminoglycoside resistance gene, aac(6')-31, and Its dissemination among genetically unrelated clinical isolates in a Brazilian hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 51, n. 7, p. 2611-2614, July 2007.

MENDES, R. E. *et al.* Metallo- $\beta$ -lactamases. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 2, p. 103-113, abr. 2006.

MENEZES, C. H. P.; NEUFELD, P. M. **Bacteriologia e micologia para o laboratório clínico**. 1. ed. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter, 2006. 497p.

MENEZES, F. G. R. **Caracterização fenotípica e genotípica de bactérias do gênero *Vibrio* isoladas em alguns estuários do Estado do Ceará**. 2011. 93 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Pesca) – Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

MERWAD, A. M. A.; EL-GHAREEB, W. R.; TAISIR, S. M. Occurrence of some zoonotic vibrios in shellfish and diarrheic patients with regard to tdh gene in *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of American Science**, New York, v. 7, n. 9, p. 449-459, Sept. 2011.

MEUJO, D. A. *et al.* Reducing oyster-associated bacteria levels using supercritical fluid CO<sub>2</sub> as an agent of warm pasteurization. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 138, n. 1-2, p. 63-70, Mar. 2010.

MICHAUD, L. *et al.* Effect of particulate organic carbon on heterotrophic bacterial populations and nitrification efficiency in biological filters. **Aquacultural Engineering**, Oxford, v. 34, n. 3, p. 224-233, May 2006.

MILHOME, M. A. L. *et al.* Avaliação do potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas aplicados na agricultura do Baixo Jaguaribe, CE. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 3, p. 363-372, jul./set. 2009.

MINGUEZ, L. *et al.* Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) parasites: Potentially useful bioindicators of freshwater quality? **Water Research**, Oxford, v. 45, n. 2, p. 665-673, Jan. 2011.

MIZUNO, T. *et al.* Modulation of *Vibrio mimicus* hemolysin through limited proteolysis by an endogenous metalloprotease. **FEBS Journal**, Oxford, v. 276, p. 825-834, Feb. 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.org/pdf/rsp/v34n1/1377.pdf>>. Acesso em: 18 nov. 2008.

MOLINA-AJA, A. *et al.* Plasmid profiling and antibiotic resistance of *Vibrio* strains isolated from cultured penaeid shrimp. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v. 213, n. 1, p. 7-12, July 2002.

MORAES, I. R. *et al.* Estudo da radiosensibilidade ao <sup>60</sup>Co do *Vibrio cholerae* O1 incorporado em ostras. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 29-32, fev. 2000. Disponível em: <[http://www.cetem.gov.br/publicacao/serie\\_anais\\_XIII\\_jic\\_2005/Pedro%20Felix%20da%20Silva%20Neto.pdf](http://www.cetem.gov.br/publicacao/serie_anais_XIII_jic_2005/Pedro%20Felix%20da%20Silva%20Neto.pdf)>. Acesso em: 18 nov. 2008.

MORRIS JR, J. G. Cholera and other types of vibriosis: a story of human pandemics and oysters on the half shell. **Clinical Infectious Diseases**, Cary, v. 37, n. 1, p. 272, July 2003.

MUNN, C. B.; MARCHANT, H. K.; MOODY, A. J. Defences against oxidative stress in vibrios associated with corals. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 281, n. 1, p. 58-63, Apr. 2008.

MURRAY, P. R. *et al.* **Manual of Clinical Microbiology**. American Society for Microbiology ASM PRESS Washington, D.C. Library of Congress Cataloging-in-Publication, 7th ed. 2005. 1773p.

- MURRAY, P. R. *Vibrio, Aeromonas e Plesiomonas*. In: \_\_\_\_\_. **Microbiologia Médica**, 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap. 30, p. 265-271.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFAÜER, M. A. *Vibrio y Aeromonas*. In: \_\_\_\_\_. **Microbiología Médica**. 5. ed. Madrid: Elsevier España, 2006. cap. 32, p. 339-345.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORIAL STANDARDS - (NCCLS). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement, v. 25, n. 1, M100-S14, 2005.
- NAWAZ, M. *et al.* Biochemical and molecular characterization of tetracycline-resistant *Aeromonas veronii* isolates from catfish. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 10, p. 6461-6466, Oct. 2006.
- NDI, O. L.; BARTON, M. D. Resistance determinants of *Pseudomonas* species from aquaculture in Australia. **Journal of Aquaculture Research & Development**, Los Angeles, v. 3, n.1, p. 1-6, Jan. 2012.
- NOGUEROLA, I.; BLANCH, A. R. Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomous keys. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 105, n. 1, p. 175-185, July 2008.
- NONAKA, L.; IKENO, K.; SUZUKI, S. Distribution of tetracycline gene, *tet(M)*, in Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from sediment and seawater at a coastal aquaculture site in Japan. **Microbes and Environments**, Ibaraki, v. 22, n. 4, p. 355-364, Dec. 2007.
- NOORLIS, A. *et al.* Prevalence and quantification of *Vibrio* species and *Vibrio parahaemolyticus* in freshwater fish at hypermarket level. **International Food Research Journal**, Malaysia, v. 18, n. 2, p. 689-695, sem. 2011.
- NORHANA, N. M. W. *et al.* Prevalence, persistence and control of *Salmonella* and *Listeria* in shrimp and shrimp products: A review. **Food Control**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 343-361, Apr. 2010.
- NUNES, C. E. V. **Controle adaptativo da remoção de nitrato no processo de lodo ativado**. 2009. 77 f. Monografia (Graduação em Engenharia Elétrica com ênfase em Eletrônica) – Departamento de Engenharia Elétrica, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2009.
- NUÑEZ, M. P. *et al.* Crecimiento y sobrevivencia de la ostra de mangle *Crassostrea rhizophorae* bajo condición de cultivo intermareal y submareal. **Zootecnia Tropical**, Maracay, v. 28, n. 2, p. 239-254, June 2010.
- ODU, N. N. *et al.* Occurrence of potentially pathogenic *Vibrio* species in some edible molluscs from Kalarugbani creek in Okirika LGA, River State, Nigeria. **Archives of Applied Science Research**, Mmabatho, v. 3, n. 4, p. 248-255, July/Aug. 2011.
- OPLUSTIL, C. P. *et al.* **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. 2. ed. São Paulo: Editora Sarvier. 2004. 232p.

OSTRENSKY, A.; BORCHETTI, J. R.; SOTO, D. **Aqüicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília: Editora dos Autores, 2008. 271 p.

OTTAVIANI, D. *et al.* Antimicrobial susceptibility of potentially pathogenic halophilic vibrios isolated from seafood. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 18, p. 135-140. Aug. 2001.

OZER, S. *et al.* Genetic heterogeneity and antibiotic susceptibility of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from horse-mackerel (*Trachurus trachurus* L., 1758). **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, İstanbul, v. 32, n. 2, p. 107-112, Mar. 2008.

PAILLARD, C.; ROUX, F. L.; BORREGO, J. J. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: trends and evolution. **Aquatic Living Resources**, Les Ulis, v. 17, n. 4, p. 477-498, Oct. 2004.

PAILLARD, C.; ASHTON-ALCOX, K. A.; FORD, S. E. Changes in bacterial densities and hemocyte parameters in eastern oysters, *Crassostrea virginica*, affected by juvenile oyster disease. **Aquatic Living Resources**, Les Ulis, v. 9, n. 2, p.145-158, Apr. 1996.

PAIVA NETTO, J. V. **Antibióticos e quimioterápicos em medicina veterinária**. 1. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1989. 181p.

PARANJPYE, R. N.; STROM, M. S. Colonization of shellfish by pathogenic vibrios. **Oceans**, Washington, v. 2, p. 1099-1103. Sept. 2005.

PARVATHI, A. *et al.* Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin, India. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, n. 2, p. 269-275, Apr./June 2009.

PASS, D. A.; DYBDAHL, R.; MANNION, M. M. Investigations into the causes of mortality of the pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jamson), in Western Australia. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 65, n. 2, p. 149-169, Mar. 1987.

PAVLOV, D. *et al.* Potentially pathogenic features of heterotrophic plate count bacteria isolated from treated and untreated drinking water. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 92, n. 3, p. 275-87, May 2004.

PELCZAR JR., M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia, Conceitos e Aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996. v. 1, 524p.

PEREIRA, C. S. *et al.* *Vibrio* spp. Isolados a partir de mexilhões (*Perna perna*) *in natura* e pré-cozidos de estação experimental de cultivo, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimento**, Campinas, v. 27, n. 2, jun. 2007.

PEREIRA, C. S.; VIANA, C. M.; RODRIGUES, D. P. *Vibrio parahaemolyticus* produtores de urease isolados a partir de ostras (*Crassostrea rizophorae*) coletadas *in natura* em restaurantes e mexilhões (*Perna perna*) de banco natural. **Ciência e Tecnologia de Alimento**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 591-595, dez. 2004.

PEREIRA, C. S.; VIANA, C. M.; RODRIGUES, D. P. Vibrios patogênicos em ostras (*Crassostrea rhizophorae*) servidas em restaurantes no Rio de Janeiro: um alerta para a saúde pública. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 40, n. 3, jun. 2007.

PEREIRA, F. S. Metodologias de avaliação da virulência em *Vibrio* spp. In: CONGRESSO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 1., 2002, Oeiras. **Anais do Congresso de Ciências Veterinárias: 100 anos da SPCV**, Oeiras, 2002, p. 281-286. Disponível em:<<http://horta.0catch.com/congressospcv/41.pdf>>. Acesso em: 12 nov. 2008.

PEREIRA, O. M. *et al.* Crescimento da ostra *Crassostrea brasiliiana* semeada sobre tabuleiro em diferentes densidades na região estuarina-lagunar de Cananéia-SP (25°S, 48°W). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 85-95, sem. 2001.

PERERA, M. L.; RANASINGHE, G. R. Prevalence of *Bacillus cereus* and associated risk factors in chinese-style fried rice available in the city of Colombo, Sri Lanka. **Foodborne Pathogens and Disease**, New Rochelle, v. 9, n. 2, p. 125-131, Feb. 2012.

PERRETEN, V.; KOLLOFFEL, B.; TEUBER, M. Conjugal transfer of the Tn916-like transposon TnFO1 from *Enterococcus faecalis* isolated from cheese to other Gram-positive bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 20, n. 1, p. 27-38, Jan. 1997.

POIREL, P. *et al.* Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant *QnrA*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 49, n. 8, p. 3523-3525, Aug. 2005b.

POIREL, P. *et al.* Vibrionaceae as a possible source of *Qnr-like* quinolone resistance determinants. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 56, n. 6, p. 1118-1121, Dec. 2005a.

POUVREAU, S. *et al.* Gametogenic cycle and reproductive effort of the tropical blacklip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (Bivalvia: Pteridae) cultivated in Takapoto atoll (French Polynesia). **Aquatic Living Resources**, Les Ulis, v. 13, n. 1, p. 37-48, Jan. 2000.

PRAPAIWONG, N.; WALLACE, R. K.; ARIAS, C. R. Bacterial loads and microbial composition in high pressure treated oysters during storage. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 131, n. 2-3, p. 145-150, May 2009.

PRESCOTT, J. F. Beta-lactam antibiotics: Cephalosporins. In: GIGUÈRE, S. *et al.* **Antimicrobial therapy in veterinary medicine**. 4th ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2006. chap. 8, p. 139-158.

PRIETO, A.; MONTES, A.; RUIZ, L. J. Potencial de producción de biomasa en una población natural de la ostra *Crassostrea rhizophorae*, en la Laguna Grande de Obispo, Golfo de Cariaco, Venezuela. **Interciencia**, Caracas, v. 33, n. 10, p. 747-753, oct. 2008.

PRUZZO, C.; GALLO, G.; CANESI, L. Persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components. **Environmental Microbiology**, Malden, v. 7, n. 6, p. 761-772, June 2005.

- PUJALTE, M. J. *et al.* Aerobic and facultative anaerobic heterotrophic bacteria associated to Mediterranean oysters and seawater. **International Microbiology**, Barcelona, v. 2, n. 4, p. 259-266, Dec. 1999.
- QI, Z. *et al.* Probiotics in aquaculture of China — current state, problems and prospect. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 290, n. 1-2, p. 15-21, May 2009.
- QUINTEIRA, S.; SOUSA, J. C.; PEIXE, L. Characterization of In100, a new integron carrying a metallo- $\beta$ -lactamase and a carbenicillinase, from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 49, n. 1, p. 451-3, Jan. 2005.
- RAHIMAN, K. M. M. *et al.* Probiotic effect of *Bacillus* NL110 and *Vibrio* NE17 on the survival, growth performance and immune response of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). **Aquaculture Research**, Malden, v. 41, n. 9, p. 120-134, Aug. 2010.
- RAMALIVHANA, J. N.; OBI, C. L.; MOYO, S. R. Antimicrobial susceptibility testing of *Aeromonas hydrophila* isolated from Limpopo Province, South Africa using VITEK 2 system, Micro Scan WalkAway, disk diffusion and E-test method. **African Journal of Microbiology Research**, Lagos, v. 3, n. 12, p. 903-913, Dec. 2009.
- RAMAMURTHY, T. *et al.* *Vibrio mimicus* with multiple toxin types isolated from human and environmental sources. **Journal of Medical Microbiology**, Berks, v. 40, n. 3, p. 194-196, Mar. 1994.
- RAMESHKUMAR, N.; NAIR, S. Isolation and molecular characterization of genetically diverse antagonistic, diazotrophic red-pigmented vibrios from different mangrove rhizospheres. **FEMS Microbiology Ecology**, Malden, v. 67, n. 3, p. 455-467, Mar. 2009.
- RAMSDEN, S. J. *et al.* Phenotypic and genotypic analysis of bacteria isolated from three municipal wastewater treatment plants on tetracycline-amended and ciprofloxacin-amended growth media. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 109, n. 5, p. 1609-1618, Nov. 2010.
- RAVI, A. V. *et al.* Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic Vibrios in marine aquaculture. **Letters in Applied Microbiology**, Malden, v. 45, n. 2, p. 219-223, Aug. 2007.
- REBOUÇAS, R. A. **Monitoramento da microbiota bacteriana da água em um sistema fechado de cultivo em uma estação de piscicultura marinha**. 2010. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.
- REBOUÇAS, R. H. *et al.* Antimicrobial resistance profile of *Vibrio* species isolated from marine shrimp farming environments (*Litopenaeus vannamei*) at Ceará, Brazil. **Environmental Research**, San Diego, v. 111, n. 1; p. 21-24, Jan. 2011.
- RECHE, M. H. L. R.; PITTOL, M.; FIUZA, L. M. Bactérias e bioindicadores de qualidade de águas de ecossistemas orizícolas da região sul do Brasil. **Oecologia Australis**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 2, p. 452-463, June 2010.

REMILY, E. R.; RICHARDSON, L. L. Ecological physiology of a coral pathogen and the coral reef environment. **Microbial Ecology**, New York, v. 51, p. 345-352, Apr. 2006.

REYES-VELÁZQUEZ, C. *et al.* Pathogenic vibrios in the oyster *Crassostrea virginica* in the lagoon system of Mandinga, Veracruz, Mexico. **Hidrobiológica**, Mexico City, v. 20, n. 3, p. 238-245, Dec. 2010.

RIOS, E. C. **Seashells of Brazil**. 2th ed. Rio Grande: Ed. FURG, 1994. 492 p.

ROCHA, R. S. **Perfil de susceptibilidade antimicrobiana e preliminar de virulência entre cepas de *Vibrio* spp. isoladas da água e sedimento do estuário do rio Acaraú, Ceará Brasil**. 2011. 85 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

RODAS-SUÁREZ, O. R. *et al.* Occurrence and antibiotic sensitivity of *Listeria monocytogenes* strains isolated from oysters, fish, and estuarine water. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 11, p. 7410-7412, Nov. 2006.

RODGERS, C. J.; FURONES, M. D. Antimicrobial agents in aquaculture: practice, needs and issues. **Options Méditerranéennes**, Paris, v. 1, n. 86, p. 41-59, 2009.

RODRIGUES, S. M. A. *et al.* Pesquisa de bactérias do gênero *Vibrio* em feridas cutâneas de pescadores do município de Raposa-MA. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 34, n. 5, p. 407-411, set./out. 2001.

RODRIGUEZ, A. I.; HARIHARAN, H.; NIMROD, S. Occurrence and antimicrobial drug resistance of potential bacterial pathogens from shellfish, including queen conchs (*Strombus gigas*) and whelks (*Cittarium pica*) in Grenada. **Microbiology**, New York, v. 2, n. 5, p. 1-11, July 2011.

ROJAS, M. V. R. *et al.* Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters and mussels in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 53, n. 4, p. 201-205, June/July 2011.

RONG, C. *et al.* Combined effect of ozonated water and chitosan on the shelf-life of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Oxford, v. 11, p. 108-112, Jan. 2010.

ROQUE, A. *et al.* Detection and Identification of tdh- and trh-Positive *Vibrio parahaemolyticus* Strains from Four Species of Cultured Bivalve Molluscs on the Spanish Mediterranean Coast. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 23, p. 7574-7577, Dec. 2009.

ROQUE, A. *et al.* In vitro susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 17, n. 5, p. 383-387, May 2001.

ROSE, J. M. *et al.* Occurrence and patterns of antibiotic resistance in vertebrates off the Northeastern United States coast. **FEMS Microbiology Ecology**, Malden, v. 67, n. 3, p. 421-431, Mar. 2009.

- ROSENQUIST, H. *et al.* Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v. 250, n. 1, p. 129-136, Sept. 2005.
- ROUSK, J. *et al.* Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. **ISME Journal**, New York, v. 4, n. 10, p. 1340-1351, Oct. 2010.
- RUBY, E. G. *et al.* Complete genome sequence of *Vibrio fischeri*: a symbiotic bacterium with pathogenic congeners. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Danvers, v. 102, n. 8, p. 3004-3009, Feb. 2005.
- RUSSELL, J. B.; DOMBROWSKI, D. B. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 39, n. 3, p. 604-610, Mar. 1980.
- SAGA, T. *et al.* *Vibrio parahaemolyticus* chromosomal qnr homologue VPA0095: demonstration by transformation with a mutated gene of its potential to reduce quinolone susceptibility in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 49, n. 5, p. 2144-2145, May 2005.
- SANDLUND, N. *et al.* Immunohistochemistry of great scallop *Pecten maximus* larvae experimentally challenged with pathogenic bacteria. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf Luhe, v. 69, n. 2-3, p. 163-173, Apr. 2006.
- SAULNIER, D. *et al.* A large-scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to pacific oyster *Crassostrea gigas* and correlation between virulence and metalloprotease-like activity. **Microbial Ecology**, New York, v. 59, n.4, p. 787-798, May 2010.
- SCHETS, F. M. *et al.* Potentially human pathogenic *Vibrios* in marine and fresh bathing waters related to environmental conditions and disease outcome. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Jena, v. 214, n. 5, p. 399-406, Sept. 2011.
- SCHMIDT, A. S. *et al.* Incidence, distribution and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile aeromonads from fish farming environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 12, p. 5675-5682, Dec. 2001.
- SCHWARZ, S. *et al.* Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. **FEMS Microbiology Reviews**, Malden, n. 28, p. 519-542, Nov. 2004.
- SHANDERA, W. X. *et al.* Disease from infection with *Vibrio mimicus*, a newly recognized *Vibrio* species. Clinical characteristics and edipemiology. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 99, n. 2, p. 169-71, Aug. 1983.
- SHARMA, M.; THAPALIYA, H. P. Antibiotic profiling of heavy metal resistant bacterial isolates from the effluent of a garment industry in Lalitpur, Nepal. **Our Nature**, Biratnagar, v. 7, p. 203-206, year 2009.

SHEHANE, D. S.; SIZEMORE, R. K. Isolation and preliminary characterization of bacteriocins produced by *Vibrio vulnificus*. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 92, n. 2, p. 322-328, Jan. 2002.

SHEN, X. *et al.* Identification of *Vibrio campbellii* isolated from cultured pacific oyster. **Acta Microbiologica Sinica**, Beijing, v. 45, n. 2, p. 177-180, Apr. 2005.

SHIEH, W. Y. *et al.* *Vibrio ruber* sp. nov., a red, facultatively anaerobic, marine bacterium isolated from sea water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v.53, p. 479-484, Mar. 2003.

SILVA, C. M. **Detecção de *Aeromonas* spp. em amostras de água superficial e sedimento ao longo de um gradiente de salinidade no estuário do rio Cocó - Ceará.** 2009. 90 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

SILVA, G. A.; ALMEIDA, E. A. Production of yellow-green fluorescent pigment by *Pseudomonas fluorescens*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.49, n. 3, p. 411-419, May 2006.

SILVEIRA, C. B. *et al.* Influence of salinity on bacterioplankton communities from the brazilian rain forest to the coastal Atlantic Ocean. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 3, p. 1-8, Mar. 2011.

SIQUEIRA, A.; KOLM, H. E. Bacterioplâncton na desembocadura da Gamboa do Maciel, Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. **Revista Saúde e Ambiente**, Joinville, v. 6, n. 1, p. 20-28, June 2005.

SMIDDY, M. *et al.* Greater high-pressure resistance of bacteria in oysters than in buffer. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Oxford, v. 6, p. 83-90, Mar. 2005.

SOUSA, O. V. **Avaliação do perfil da comunidade microbiana de ecossistemas de manguezal receptores de efluentes da atividade de cultivo de camarão no Estado do Ceará, Brasil.** 2006. 106 f. Tese (Doutorado em Ciências - Microbiologia) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Rio de Janeiro, 2006.

SOUSA, O. V. *et al.* Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in oyster, *Crassostrea rhizophorae*, collected from a natural nursery in the Cocó river Estuary, Fortaleza, Ceará, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 46, n. 2, p. 59-62, Mar./Apr. 2004.

SOUSA, O. V. *et al.* The impact of shrimp farming effluent on bacterial communities in mangrove waters, Ceará, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 52, n. 2, p. 1725-1734, Dec. 2006.

STABILI, L.; CAVALLO, R. A. Diversity of culturable heterotrophic bacterial in the Southern Adriatic sea Italian coastal waters. **Scientia Marina**, Barcelona, v. 68, suppl. 1, p. 31-41, 2004.

STABILI, L.; CAVALLO, R. A. Microbial pollution indicators and culturable heterotrophic bacteria in a Mediterranean area (Southern Adriatic Sea Italian coasts). **Journal of Sea Research**, Amsterdam, v. 65, p. 461-469, May 2011.

STACKEBRANDT, E. *et al.* Re-evaluation of the status of the genus *Oerskovia*, reclassification of *Promicromonospora enterophila* (Jager *et al.* 1983) as *Oerskovia enterophila* comb. nov. and description of *Oerskovia jenensis* sp. nov. and *Oerskovia paurometabola* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 52, n. 4, p. 1105-1111, July 2002.

STALEY, J. T. *et al.* **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Proteobacteria**. 2th ed. New York: Springer, 2005. v. 2, part B, 1388p.

STROHL, W. A.; ROUSE, H.; FISHER, B. D. Vacinas e antibióticos. *In:* \_\_\_\_\_. **Microbiologia Ilustrada**. 1. ed., Porto Alegre, Artmed Editora. 2004. cap. 5 p.49-64.

SUGITA, H.; ITO, Y. Identification of intestinal bacteria from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and their ability to digest chitin. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 43, n. 3, p. 336-342, Sept. 2006.

TAVARES, W. Carbapenemas e monobactâmicos. *In:* \_\_\_\_\_. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**. São Paulo: Atheneu, 2007a. cap. 12, p. 203-211.

TAVARES, W. Cefalosporinas. *In:* \_\_\_\_\_. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**. São Paulo: Atheneu, 2007b. cap. 11, p. 179-201.

TAVARES, W. Cloranfenicol e tianfenicol. *In:* \_\_\_\_\_. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**. São Paulo: Atheneu, 2007c. cap. 18, p. 299-307.

TAVARES, W. Introdução ao estudo dos antimicrobianos. *In:* \_\_\_\_\_. **Manual de Antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 3 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2001. v.1, cap. 1, p. 1-17.

TAVARES, W. Introdução ao estudo dos antimicrobianos. *In:* \_\_\_\_\_. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**. São Paulo: Atheneu, 2007c. cap. 1, p. 1-10.

TENDENCIA, E. A.; PENÃ, L. D. L. Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 195, n. 3-4, p. 193-204, Apr. 2001.

TEODORO, V. A. M. *et al.* Aplicação da técnica de PCR na detecção de *Yersinia enterocolitica* em suínos abatidos sem inspeção. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Minas Gerais, v. 58, n. 1, p. 9-14, Feb. 2006.

THOMAZ, S. M. O papel ecológico das bactérias e teias alimentares microbianas em ecossistemas aquáticos. *In:* POMPEO, M. L. M. **Perspectivas da Limnologia no Brasil**. São Luís: Gráfica e Editora União, 1999. p. 147-167.

THOMPSON, F. L.; LIDA, T.; SWINGS, J. Biodiversity of vibrios. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 68, n. 3, p. 403-431, Sept. 2004.

THOMPSON, F. L.; THOMPSON, C. C.; SWINGS, J. *Vibrio tasmaniensis* sp. nov., isolated from Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 26, n.1, p. 65-69, Mar. 2003.

TOMÉ, E. *et al.* *In vitro* tests of suitability of bacteriocin-producing lactic acid bacteria, as potential biopreservation cultures in vacuum-packaged cold-smoked salmon. **Food Control**, Oxford, v. 19, n. 5, p. 535-543, May 2008.

TORANZO, A. E.; MAGARIÑOS, B.; ROMALDE, J. L. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 246, n. 1, p. 37-61. May 2005.

TRABULSI, L. R.; MIMICA, I. M.; MIMICA, L. M. J. Caracterização dos principais grupos de antibacterianos: espectro de ação e indicações. *In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia*. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. cap. 10, p. 87-91.

TURNBULL, P. C. B. *et al.* MICs of selected antibiotics for *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, and *Bacillus mycoides* from a range of clinical and environmental sources as determined by the Etest. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 8, p. 3626-3634, Aug. 2004.

URURAHY, A. F. P. **Biodegradação de resíduo oleoso proveniente de refinaria de petróleo**. 1998. 344 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1998.

VALLEY, K. J. *et al.* Bacterial community profiling of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*): comparison of culture-dependent and culture-independent outcomes. **Journal of Shellfish Research**, Groton, v. 28, n. 4, p. 827-835. Dec. 2009.

VASEEHARAN, B. *et al.* *In vitro* susceptibility of antibiotics against *Vibrio* spp. and *Aeromonas* spp. isolated from *Penaeus monodon* hatcheries and ponds. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 26, p. 285-291, Oct. 2005.

VASEEHARAN, B.; RAMASAMY, P. Abundance of potentially pathogenic micro-organisms in *Penaeus monodon* larvae rearing systems in India. **Microbiological Research**, Jena, v. 158, n. 4, p. 299-308, Dec. 2003.

VATTAKAVEN, T. *et al.* Differential effects of temperature and starvation on induction of the viable-but-nonculturable state in the coral pathogens *Vibrio shiloi* and *Vibrio tasmaniensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 10, p. 6508-6513, Oct. 2006.

VEIGA, A. *et al.* **Perfil de risco dos principais alimentos consumidos em Portugal**. Lisboa: ASAE, 2009. p. 330.

VIEIRA, C. B. *et al.* *Vibrio* spp. em hemolinfa de camarões *Litopenaeus vannamei* coletados em três fazendas de cultivo do Estado do Ceará. **Boletim Técnico-Científico do CEPNOR**, Belém, v. 9, p. 141-149, ano 2009.

VIEIRA, R. H. S. F. *et al.* Análise experimental sobre a viabilidade de *Escherichia coli* em água do mar. **Arquivos de Ciências do Mar**, Fortaleza, v. 34, p. 43-48, ano 2001.

VIEIRA, R. H. S. F. *et al.* Aspectos microbiológicos de águas estuarinas nos estados do Rio Grande do Norte e Ceará. **Arquivo de Ciências do Mar**, Fortaleza, v. 40, n. 1, p. 89-95, 2007.

VIEIRA, R. H. S. F. *et al.* Kanagawa-negative, *tdh*- and *trh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* isolated from fresh oysters marketed in Fortaleza, Brazil. **Current Microbiology**, New York, v. 63, n. 2, p. 126-30, Aug. 2011.

VIEIRA, R. H. S. F. *et al.* Raw oysters can be a risk for infections. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 14, n. 1, p. 66-70. Jan./Feb. 2010b.

VIEIRA, R. H. S. F. *et al.* *Vibrio* na água e sedimento de viveiros de quatro fazendas de carcinicultura no estado do Ceará, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 47, n. 6, p. 454-460, nov./dec. 2010a.

VIEIRA, R. H. S. F.; SAKER-SAMPAIO, S. Doenças transmitidas por alimentos (DTA). *In: VIEIRA, R. H. S. F. Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: Teoria e pratica*. 1. ed. São Paulo: Varela, 2004. p. 89-94.

VIEIRA, R. H. S. F.; VASCONCELOS, R. F.; CARVALHO, E. M. R. Quantificação de víbrios, de coliformes totais e termotolerantes em ostra nativa *Crassostrea rhizophorae*, e na água do estuário do Rio Jaguaribe, Fortim-CE. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 1, n. 1, p. 1-13, jan./jun. 2007. Disponível em: <<http://www.higieneanimal.ufc.br/images/HigieneV1n12007.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2007.

VIEIRA, V. V. *et al.* Differentiation of environmental and clinical isolates of *Vibrio mimicus* from *Vibrio cholerae* by multilocus enzyme electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n.5, p. 2360-2364, May 2001.

VILANOVA, M. F. V.; FONTELES-FILHO, A. A. Análise da biometria e do fator de condição da ostra-do-mangue, *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) (Mollusca, Bivalvia) no estuário do Rio Ceará, Ceará, Brasil. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 41, n. 11, p. 1117-1124, ano 1989.

VILLAMIL, L. *et al.* Isolation of a highly pathogenic *Vibrio pelagius* strain associated with mass mortalities of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), larvae. **Journal of Fish Diseases**, Malden, v. 26, p. 293-303. May 2003.

WARD, L. N.; BEJ, A. K. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish by use of multiplexed real-time PCR with TaqMan fluorescent probes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 3, p. 031-2042, Mar. 2006.

WHO - World Health Organisation. **Overcoming antimicrobial resistance world health report on infectious diseases** 2000. Geneva, 2000. Disponível em: <[http://www.who.int/infectious-disease-report/2000/other\\_versions/index-rpt2000\\_text.html#epilogue](http://www.who.int/infectious-disease-report/2000/other_versions/index-rpt2000_text.html#epilogue)>. Acesso em: 29 out. 2011.

WOODFORD, N. *et al.* Carbapenemases of *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum*: distribution of *blaB* and characterization of a novel metallo- $\beta$ -lactamase gene, *blaB3*, in the type strain, NCTC 10016. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 44, n. 6, p. 1448-52, June 2000.

YAN, H. *et al.* Prevalence and characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes* isolates in Hebei province of Northern China, 2005–2007. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 144, n. 2, p. 310-316, Dec. 2010.

YANO, Y. *et al.* Diversity and characterization of oxytetracycline-resistant bacteria associated with non-native species, white-leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*), and native species, black tiger shrimp (*Penaeus monodon*), intensively cultured in Thailand. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 110, p. 713-722, Mar. 2011.

ZAKY, M. M. M.; MANSOUR, F. A.; PERSSON, K. M. Factors influencing multi-drug resistant and plasmid DNA harbouring *Aeromonas hydrophila* isolated from Lake Manzala, Egypt. **Journal of Bacteriology Research**, Lagos, v. 2, n. 4, p. 30-40, Sept. 2010.

ZANETTI, S. *et al.* *In vitro* susceptibility of *Vibrio* spp. isolated from the environment. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 17, p. n. 5, 407-409, May 2001.

ZENG, Y. *et al.* Bacterial diversity in various coastal mariculture ponds in Southeast China and in diseased eels as revealed by culture and culture-independent molecular techniques. **Aquaculture Research**, Malden, v. 4, p.172-186, Aug. 2010.

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

ZHAO, B.; HE, Y. L.; ZHANG, X. F. Nitrogen removal through heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by heterotrophic nitrifier of *Bacillus* sp. LY. **Environmental Technology**, Abingdon, v. 31, n. 4, p. 409-416, Apr. 2010.

ZHAO, J.; DANG, H. Coastal Seawater bacteria harbor a large reservoir of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Jiaozhou Bay, China. **Microbial Ecology**, New York, p. 1-13, Jan. 2012.

ZHU, G. *et al.* Performance and optimization of biological nitrogen removal process enhanced by anoxic/oxic step feeding. **Biochemical Engineering Journal**, Switzerland, v. 43, n. 3, p. 280-287, Mar. 2009.

ZHUANG, S. The influence of salinity, diurnal rhythm and daylength on feeding behavior in *Meretrix meretrix* Linnaeus. **Aquaculture**, Amsterdam, v.252, p.584-590, Mar. 2006.