



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA**

RAFAEL DOS SANTOS ROCHA

**CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA DA COMUNIDADE BACTERIANA
HETEROTRÓFICA DE AMBIENTE DE CARCINICULTURA FRENTE ÀS
TETRACICLINAS**

FORTALEZA

2016

RAFAEL DOS SANTOS ROCHA

**CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA DA COMUNIDADE BACTERIANA
HETEROTRÓFICA DE AMBIENTE DE CARCINICULTURA FRENTE ÀS
TETRACICLINAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Biotecnologia de Recursos Aquáticos.

Orientador: Prof. Dr. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- R576c Rocha, Rafael dos Santos.
Caracterização polifásica da comunidade bacteriana heterotrófica de ambiente de carcinicultura frente às tetraciclinas. / Rafael dos Santos Rocha. – 2016.
105 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias,
Departamento de Engenharia de Pesca, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca,
Fortaleza, 2016.
Área de Concentração: Biotecnologia de Recursos Aquáticos.
Orientação: Profa. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira.
1. Carcinicultura. 2. Antibacterianos. 3. *Vibrionaceae*. I. Título.

CDD 639.2

RAFAEL DOS SANTOS ROCHA

CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA DA COMUNIDADE BACTERIANA
HETEROTRÓFICA DE AMBIENTE DE CARCINICULTURA FRENTE ÀS
TETRACICLINAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Biotecnologia de Recursos Aquáticos.

Aprovada em: 11 / 03 / 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Oscarina Viana de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Sandra Tédde Santaella
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Suzana Claudia Silveira Martins
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

À minha a avó Maria Martins (*in memoriam*),
pela saudade e ensinamentos que serão
eternos.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora Profa. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira: exemplo máximo de responsabilidade, competência, paciência e sucesso como docente. Minha mais profunda gratidão não somente pela orientação no doutorado, como também por ser mentora de minha vida acadêmica. A Sra. é inquestionavelmente insubstituível! Muito Obrigado!

À Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa: pela dedicação, competência, responsabilidade, perseverança e generosidade em sanar todas as minhas dúvidas e questionamentos. A você toda a sorte do mundo. Muito Obrigado!

AGRADECIMENTOS

Agradecer é o ato de reconhecer aqueles que estiveram direta ou indiretamente comigo nessa caminhada de doutoramento, por isso, externalizo minha gratidão:

Aos meus pais: meus mestres, meus amigos, minha fonte inesgotável de amor. Pelos sorrisos, pelos abraços apertados, pelo "patrocínio", pelas viagens-presente-surpresa, pelos choros nas idas, pelos sorrisos nas voltas, pelos puxões de orelha, pelo alento, pela palavra dita, pela palavra não dita, pelos ensinamentos, pela presença, pela doação, pelo incentivo, pela cobrança, pela paciência... Amo vocês incondicionalmente!

Ao meu irmão: pela amizade, companheirismo e infindáveis viagens "Casa-Labomar-Casa". Te amo, brother!

Aos meus sobrinhos: desconhecia o que era "amor de tio" até tê-los em minha vida. Amo vocês, meu pequenos!

Aos meus queridos amigos (To my dear friends): Ana Magalhães, Arthur Lima, Bráulio Melo, Candice Donovan, Francisco Brito, Gustavo Sales, Jean-Baptiste, Jonatas Almeida, Ludimila Amorim, Paul Miller, Pietro Sánchez, Rodrigo Pezarollo, Rodrigo Bragança, Rubens Arruda, Tom Donovan, e Victor Cortez. Obrigado pelo companheirismo, paciência e por me permitirem viver em um mundo além do acadêmico. Amo vocês! (Thanks for companionship, for patience and for allowing me to live beyond the college world. I love you!).

À Lana Leite: pelo apreço, amizade, lágrimas, abraços e beijos.

À Ariadne Elisa: pelo sorriso, amizade, torcida e pensamento positivo.

À Dra. Camila Magalhães: pelos risos, amizade, responsabilidade e torcida.

À Thiara Amaral: pelo gênio indomável, ombro amigo, choros e risos.

À Rebeca Martins: pelas conversas, risos, caronas e serenidade de ser.

À Dra. Gleire Menezes: pela dedicação, responsabilidade, firmeza, ajuda incomensurável na realização dos experimentos e pela permissão de integrar o meu projeto de doutorado ao seu projeto de pós-doutorado. Este trabalho só foi possível graças a você. Muito Obrigado!

À Dra. Cristiane Teles: pela ajuda, riso incomparável e presteza para com todos no Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado. Não imagino o laboratório sem você!

Aos companheiros de laboratório: Adalva, Adson, Daniel, Deborah, Edirsana, Fernanda, Giselle, Graciene, Hemmily, Jade, Jéssica, Karla, Lorrana, Marina, Raquel, Rosa, Rubson, Sylvânio, Victor e Wesley. Certamente os dias com vocês no laboratório foram recompensadores e inesquecíveis.

Aos colegas do Laboratório de Histopatologia, do Instituto de Ciências do Mar: Rubens, Jamille e Graça e, em especial, ao Prof. Dr. Rodrigo Maggioni pela disponibilidade de fazer uso do laboratório para os experimentos de Biologia Molecular.

À minha banca de defesa: Profa. Dra. Sandra Tédde Santaella, Profa. Dra. Suzana Claudia Silveira Martins e Profa. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes. Obrigado pelas valiosas sugestões que certamente engrandeceram este documento e minha formação.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, em especial à Profa. Silvana Saker, Prof. Alexandre Sampaio e Prof. Bartolomeu Souza. Vocês engrandecem o nosso Programa!

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca: Rogéria Setúbal, por sua disposição, eficiência e atenção.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos para dedicação exclusiva ao projeto de doutorado.

"A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita"

Mahatma Gandhi

RESUMO

Antimicrobianos da classe das tetraciclina têm sido extensivamente usados em aquicultura para o controle de doenças e como promotores de crescimento. Dessa forma, foi traçado como objetivo geral avaliar o perfil polifásico da comunidade bacteriana de ambiente de criação de camarão frente aos antimicrobianos das classes das tetraciclina, com enfoque no gênero *Vibrio*. Amostras de água e sedimento foram coletadas de quatro (4) fazendas de carcinicultura: duas (2) no estado do Ceará e duas (2) no estado do Rio Grande do Norte, dos pontos: estuário, canal de abastecimento, viveiro e canal de drenagem. Foram pesquisadas bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC), com resistência à tetraciclina (BHC+TET) e oxitetraciclina (BHC+OTC), *Vibrio* total, sacarose positivos e negativos pelo método de Contagem Padrão em Placas (CPP). As cepas isoladas de BHC, BHC+TET, BHC+OTC e *Vibrio* foram submetidas à identificação fenotípica. O perfil fenotípico de susceptibilidade antimicrobiana das cepas de *Vibrio* e demais BHC foi comparado entre as técnicas de disco-difusão e macrodiluição, pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) para os antimicrobianos tetraciclina e oxitetraciclina. Os genes de resistência *tet(M)*, *tet(S)*, *otr(A)* e *otr(B)* foram pesquisados nas cepas fenotipicamente caracterizadas como resistentes. A diversidade de bactérias heterotróficas foi influenciada pelos períodos de estio e chuvoso e também pelos diferentes pontos de coleta dentro das fazendas de carcinicultura. No geral, as contagens de BHC, BHC+TET e BHC+OTC e *Vibrio* e demais BHC diferiram entre os períodos de coleta, com quantificações superiores no período chuvoso para os pontos de coleta viveiro e canal de drenagem. Foram isoladas 146 cepas de BHC, 57 de BHC+TET, 25 de BHC+OTC, das quais os gêneros mais representativos foram *Vibrio* e *Enterobacter*. Foi possível o isolamento de 100 cepas de *Vibrio*, das quais *V. coralliilyticus* foi a espécie mais representativa. O perfil antimicrobiano diferiu entre as cepas de *Vibrio* e demais BHC entre as técnicas de disco-difusão e macrodiluição, sendo a de macrodiluição a mais eficiente na caracterização de resistência dentre os isolados. Todas as cepas de *Vibrio* e demais BHC, fenotipicamente resistentes, apresentaram o gene *tet(M)* como determinante de resistência, no entanto os genes *tet(S)*, *otr(A)* e *otr(B)* não foram verificados. Com isso, comprovou-se que *Vibrio* é gênero mais abundante dentre as bactérias heterotróficas com resistência às tetraciclina, estando a diversidade bacteriana fortemente influenciada pelos períodos do ano.

Palavras-chave: Carcinicultura. Antibacterianos. Vibrionaceae.

ABSTRACT

Antimicrobial agents of tetracycline class has been extensively used in aquaculture for disease control and growth promotion. Thus, the aim of this study was to evaluate the polyphase profile of the bacterial community in shrimp farming environment front antimicrobial classes of tetracyclines, focusing on *Vibrio* genus. Water and sediment samples were collected four (4) shrimp farms: two (2) in the state of Ceará and two (2) in the state of Rio Grande do Norte, of points: estuary, supply channel, pond and drainage channel. Cultivable heterotrophic bacteria (CHB), with resistance to tetracycline (CHB+TET) and oxytetracycline (CHB+OTC), total *Vibrio*, positive sucrose *Vibrio* and sucrose negative *Vibrio* were surveyed by Standard Plate Count method (SPC). The strains isolated from CHB, CHB+TET, CHB+OTC and *Vibrio* underwent phenotypic identification. The phenotypic profile of antimicrobial susceptibility of strains of *Vibrio* and other BHC was compared between the disk diffusion techniques and macrodilution by determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) for tetracycline and oxytetracycline antimicrobials. Resistance genes *tet(M)*, *tet(S)* *otr(A)* and *otr(B)* were investigated in strains characterized as phenotypically resistant. Diversity of heterotrophic bacteria is influenced by wet and rainy seasons and also by the different collection points within the shrimp farms. Overall, the CHB, CHB+TET and CHB+OTC and *Vibrio* counts differ between the collection seasons, with higher measurements during the rainy season to the points of pond and drainage channel. 146 strains of CHB, 57 of CHB+TET and 45 of CHB+OTC were isolated, of which the most representative genera were *Vibrio* and *Enterobacter*. A total of 100 strains of *Vibrio* were isolated, which *V. coralliilyticus* was the most representative species. Antimicrobial profile of *Vibrio* and other CHB differed between disk-diffusion and macrodilution techniques, being the macrodilution the most efficient in the characterization of resistance among isolates. All strains of *Vibrio* and other CHB, phenotypically resistant, presented the *tet(M)* gene as a determinant of resistance determinat, but *tet(S)* *otr(A)* and *otr(B)* genes were not observed. Thus, it proves that *Vibrio* genus is most abundant among herotrophic bacteria with resistance to tetracyclines, with the bacterial diversity strongly influenced by seasons.

Keywords: Shrimp farm. Antibacterial agents. Vibrionaceae.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fórmula química estrutural do antimicrobiano tetraciclina.....	25
Figura 2	Detalhamento da estrutura conservada dos antimicrobianos das classes das tetraciclina.....	26
Figura 3	Fórmula química estrutural do antimicrobiano oxitetraciclina.....	27
Figura 4	Localização das quatro fazendas de carcinicultura nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte.....	32
Figura 5	Placa de TCBS com <i>Vibrio</i> sacarose negativos.....	36
Figura 6	Placa de TCBS com <i>Vibrio</i> sacarose positivos.....	36
Figura 7	Fluxograma do antibiograma das cepas de <i>Vibrio</i> spp.....	40
Figura 8	Determinação do gene <i>tet(M)</i> (656 pb) para as cepas de bactérias heterotróficas fenotipicamente caracterizadas como resistentes à tetraciclina ..	87
Figura 9	Eletroforese uniplex dos isolados fenotipicamente identificados como <i>Vibrio</i> para confirmação genotípica de gênero: cepas V17 a V71 ao gene <i>vib</i> (650 pb)	88
Figura 10	Eletroforese uniplex dos isolados fenotipicamente identificados como <i>Vibrio</i> para confirmação genotípica de gênero: cepas V72 a V100 ao gene <i>vib</i> (650 pb)	89
Figura 11	Determinação do gene <i>tet(M)</i> (656 pb) para as cepas de <i>Vibrio</i> (V19 a V72) fenotipicamente caracterizadas como resistentes à tetraciclina.....	89
Figura 12	Determinação do gene <i>tet(M)</i> (656 pb) para as cepas de <i>Vibrio</i> (V73 a V100) fenotipicamente caracterizadas como resistentes à tetraciclina.....	90

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Descrição dos testes bioquímicos para identificação de <i>Vibrio</i> das amostras de água e sedimento das fazendas de carcinicultura do nordeste do Brasil.....	38
Quadro 2	Padrão interpretativo das zonas de inibição dos antimicrobianos testados pelo método de Kirby-Bauer.....	41
Quadro 3	Padrão interpretativo das concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos antimicrobianos testados pelo método de macrodiluição em caldo.....	42
Quadro 4	Códigos das combinações período/amostra/ponto de coleta para cada grupo bacteriano analisado.....	45
Quadro 5	Volumes dos reagentes da reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	47
Quadro 6	Condições da Reação em Cadeia pela polimerase (PCR) para os genes <i>tet</i> (M) e <i>tet</i> (S) para as cepas de <i>Vibrio</i> com resistência fenotípica à tetraciclina.....	48
Quadro 7	Condições da Reação em Cadeia pela polimerase (PCR) para os genes <i>otr</i> (A) e <i>otr</i> (B) para as cepas de <i>Vibrio</i> com resistência fenotípica à oxitetraciclina.....	49

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Diversidade de bactérias heterotróficas isoladas de carcinoculturas do Ceará e Rio Grande do Norte.....	57
Gráfico 2	Mapa perceptual da frequência de isolados de bactérias heterotróficas cultiváveis por combinação período de coleta/amostra/ponto de coleta.....	60
Gráfico 3	Diversidade de bactérias heterotróficas resistentes à tetraciclina e oxitetraciclina isoladas de carcinoculturas do Ceará e Rio Grande do Norte....	62
Gráfico 4	Mapa perceptual da frequência de isolados de bactérias heterotróficas cultiváveis resistentes à tetraciclina por combinação período de coleta/amostra/ponto de coleta.....	65
Gráfico 5	Mapa perceptual da frequência de isolados de bactérias heterotróficas cultiváveis resistentes à oxitetraciclina por combinação período de coleta/amostra/ponto de coleta.....	66
Gráfico 6	Diversidade de <i>Vibrio</i> spp. isolados em todos os pontos de coleta, na água e sedimento, em fazendas de carcinocultura do nordeste brasileiro.....	70
Gráfico 7	Mapa perceptual da frequência de espécies de <i>Vibrio</i> por combinação período de coleta/amostra/ponto de coleta.....	73
Gráfico 8	Perfil de susceptibilidade antimicrobiana à tetraciclina das cepas de <i>Vibrio</i> isoladas da água e sedimento de fazendas de carcinocultura do estado do Ceará e Rio Grande do Norte.....	77
Gráfico 9	Perfil de susceptibilidade antimicrobiana à oxitetraciclina das cepas de <i>Vibrio</i> isoladas da água e sedimento de fazendas de carcinocultura do estado do Ceará e Rio Grande do Norte.....	78
Gráfico 10	Número de cepas de <i>Vibrio</i> por diâmetro de halos para o antimicrobiano tetraciclina.....	79
Gráfico 11	Número de cepas de <i>Vibrio</i> por diâmetro de halos para o antimicrobiano oxitetraciclina.....	79
Gráfico 12	Concentração Inibitória Mínima (CIM) das cepas de <i>Vibrio</i> spp isoladas da água e sedimento de fazendas de carcinocultura do nordeste brasileiro.....	82

Gráfico 13	Concentração Bactericida Mínima (CBM) das cepas de <i>Vibrio</i> spp isoladas da água e sedimento de fazendas de carcinicultura do nordeste brasileiro.....	84
Gráfico 14	Comparativo do número de cepas por diâmetro dos halos de <i>Vibrio</i> para CIM do antimicrobiano tetraciclina.....	86
Gráfico 15	Comparativo do número de cepas por diâmetro dos halos de <i>Vibrio</i> para CIM do antimicrobiano oxitetraciclina.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores das variáveis ambientais para amostras de água nos pontos de coleta analisados, durante o período de estio e chuvoso, nas fazendas de carcinicultura analisadas.....	52
Tabela 2	Contagem Padrão em Placas (CPP) das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis nas fazendas de carcinicultura analisadas no ponto de coleta "estuário" no período de estio e chuvoso.....	54
Tabela 3	Contagem Padrão em Placas (CPP) das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis nas fazendas de carcinicultura analisadas no ponto de coleta "canal de abastecimento" no período de estio e chuvoso.....	54
Tabela 4	Contagem Padrão em Placas (CPP) das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis nas fazendas de carcinicultura analisadas no ponto de coleta "viveiro" no período de estio e chuvoso.....	55
Tabela 5	Contagem Padrão em Placas (CPP) das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis nas fazendas de carcinicultura analisadas no ponto de coleta "canal de drenagem" no período de estio e chuvoso.....	55
Tabela 6	Índice de diversidade (H') e dominância (C) por período de coleta, amostra e ponto de coleta das bactérias heterotróficas cultiváveis totais, resistentes à tetraciclina e resistentes à oxitetraciclina.....	58
Tabela 7	Distribuição de bactérias heterotróficas isoladas de carciniculturas do Ceará e Rio Grande do Norte por local, ponto e período de coleta.....	59
Tabela 8	Distribuição de bactérias heterotróficas com resistência à tetraciclina isoladas de carciniculturas do Ceará e Rio Grande do Norte por local, ponto e período de coleta.....	63
Tabela 9	Distribuição de bactérias heterotróficas com resistência à oxitetraciclina isoladas de carciniculturas do Ceará e Rio Grande do Norte por local, ponto	64

	e período de coleta.....	
Tabela 10	Contagem Padrão em Placas (CPP) das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de <i>Vibrio</i> nas fazendas de carcinicultura analisadas no ponto de coleta "estuário" no período de estio e chuvoso.....	68
Tabela 11	Contagem Padrão em Placas (CPP) das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de <i>Vibrio</i> nas fazendas de carcinicultura analisadas no ponto de coleta "canal de abastecimento" no período de estio e chuvoso.....	68
Tabela 12	Contagem Padrão em Placas (CPP) das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de <i>Vibrio</i> nas fazendas de carcinicultura analisadas no ponto de coleta "viveiro" no período de estio e chuvoso.....	69
Tabela 13	Contagem Padrão em Placas (CPP) das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de <i>Vibrio</i> nas fazendas de carcinicultura analisadas no ponto de coleta " canal de drenagem " no período de estio e chuvoso.....	69
Tabela 14	Diversidade de <i>Vibrio</i> isoladas de carciniculturas do Ceará e Rio Grande do Norte por ponto de coleta.....	71
Tabela 15	Diversidade de <i>Vibrio</i> isoladas de carciniculturas do Ceará e Rio Grande do Norte por período e amostra.....	72
Tabela 16	Detalhamento das cepas de bactérias hetetrotróficas resistentes à tetraciclina no ensaio de macrodiluição.....	75
Tabela 17	Detalhamento das cepas de bactérias hetetrotróficas resistentes à oxitetraciclina no ensaio de macrodiluição	75
Tabela 18	Estatística descritiva básica do tamanho dos halos das cepas de <i>Vibrio</i> spp frente aos antimicrobianos tetraciclina e oxitetraciclina por período de análise.....	80
Tabela 19	Estatística descritiva básica do tamanho dos halos das cepas de <i>Vibrio</i> spp frente aos antimicrobianos tetraciclina por ponto de análise.....	81
Tabela 20	Estatística descritiva básica do tamanho dos halos das cepas de <i>Vibrio</i> spp frente aos antimicrobianos oxitetraciclina por ponto de análise.....	81
Tabela 21	Detalhamento da cepas de <i>Vibrio</i> resistentes à tetraciclina e à oxitetraciclina no ensaio de macrodiluição.....	82

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	Carcinicultura	21
2.2	Comunidade bacteriana de ambiente de carcinicultura	22
2.3	<i>Vibrio</i>	23
2.4	Antimicrobianos	24
2.5	Tetraciclina	25
2.6	Oxitetraciclina	27
2.7	Resistência antimicrobiana	28
2.8	Deteção de resistência às tetraciclinas	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1	Local e período de coleta	32
3.2	Pontos de coleta	33
3.2.1	<i>Amostras de água</i>	33
3.2.2	<i>Amostras de sedimento</i>	33
3.3	Variáveis físico-químicas	34
3.4	Pesquisa bacteriológica	34
3.4.1	<i>Preparo das amostras de sedimento</i>	34
3.4.2	<i>Quantificação de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis</i>	34
3.4.2.1	<i>Preparo das diluições e plaqueamento</i>	34
3.4.2.2	<i>Contagem das Unidades Formadoras de Colônias</i>	35
3.4.2.3	<i>Isolamento das colônias</i>	35
3.4.3	<i>Quantificação de bactérias resistentes às tetraciclinas</i>	35
3.4.4	<i>Quantificação de Vibrio</i>	36
3.4.5	<i>Identificação Fenotípica de Vibrio</i>	36
3.4.5.1	<i>Coloração morfotintorial de Gram</i>	36
3.4.5.2	<i>Testes bioquímicos</i>	37
3.4.6	<i>Antibiograma</i>	39
3.4.6.1	<i>Preparo do Inóculo</i>	39
3.4.6.2	<i>Inoculação nas placas de teste</i>	39
3.4.6.3	<i>Aplicação dos discos de antimicrobianos</i>	40

3.4.6.4	<i>Leitura dos halos e interpretação dos resultados</i>	41
3.4.7	<i>Cura do plasmídeo</i>	41
3.4.8	<i>Concentração Inibitória Mínima</i>	42
3.4.9	<i>Concentração Bactericida Mínima</i>	42
3.4.10	<i>Índice de diversidade e dominância</i>	43
3.4.11	<i>Análise estatística</i>	43
3.4.11.1	<i>Diferença das contagens nos períodos e pontos de coleta</i>	43
3.4.11.2	<i>Diferença no tamanho dos halos de inibição bacterianos</i>	44
3.4.11.3	<i>Temperatura, salinidade e pH</i>	44
3.4.11.4	<i>Diversidade de Vibrio e demais bactérias heterotróficas cultiváveis</i>	44
3.5	Análise genotípica	45
3.5.1	<i>Extração do DNA genômico</i>	45
3.5.2	<i>Quantificação e verificação da pureza do DNA extraído</i>	46
3.5.3	<i>Amplificação das sequências de DNA de interesse</i>	46
3.5.2.1	<i>Gênero Vibrio</i>	46
3.5.2.2	<i>Genes de resistência à tetraciclina e oxitetraciclina</i>	47
3.5.3	<i>Eletroforese</i>	50
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1	Temperatura, salinidade e pH	51
4.2	Quantificação e diversidade de bactérias heterotróficas	53
4.3	Quantificação e diversidade de <i>Vibrio</i>	67
4.4	Susceptibilidade antimicrobiana	74
4.4.1	<i>Bactérias heterotróficas cultiváveis</i>	75
4.4.2	<i>Vibrio</i>	76
4.5	Testes genotípicos	87
4.5.1	<i>Bactérias heterotróficas cultiváveis</i>	87
4.5.2	<i>Vibrio</i>	88
5	CONCLUSÕES	91
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	92
	REFERÊNCIAS	93

1 INTRODUÇÃO

O aumento da resistência bacteriana aos principais antimicrobianos utilizados na terapêutica médica e veterinária tem despontado como o grande problema do século XXI (FAIR; TOR, 2014). O Brasil é o terceiro maior consumidor de antimicrobianos com fins pecuários no mundo, ficando atrás da China e dos Estados Unidos. Estima-se que em 2030 o consumo de antimicrobianos no Brasil será 50% maior que em 2010 (VAN BOECKEL *et al.*, 2015). Em cultivos de organismos, entre 40 e 90% dos antimicrobianos utilizados são excretados para o meio ambiente sob a forma dos compostos originais ou de seus metabólitos (KEMPER, 2008). Além disso, cerca de 200 mil toneladas de antimicrobianos são usadas anualmente com, aproximadamente, 90% desse montante sendo depositada como resíduo no ambiente (AALIPOUR *et al.*, 2014).

Antimicrobianos veterinários são amplamente utilizados na criação de animais para promoção de crescimento e controle de doenças (KUMAR *et al.*, 2005). Países como Canadá, China (excluindo Hong Kong), Austrália, Brasil e Ucrânia (listados em ordem decrescente da sua contribuição financeira para as exportações norte-americanas de produtos de origem animal) não têm quaisquer restrições nacionais formais sobre o uso de "antimicrobianos para fins de promoção do crescimento" (do inglês *antimicrobial growth promoters*, AGP) (MARON; SMITH; NACHMAN, 2013). Contudo, alguns países da União Européia e da Ásia adotam, legalmente, severas restrições no uso de substâncias antimicrobianas de uso veterinário (GRAVE *et al.*, 2014).

O uso desordenado e constante de antimicrobianos tem como principal consequência a seleção e manutenção de cepas bacterianas resistentes (BERENDONK *et al.*, 2015). Com isso, os relatos de bactérias com múltipla resistência a antimicrobianos, incluindo aqueles com amplo espectro de ação, tem sido cada vez mais comuns, principalmente, em espécies de interesse clínico (NIKAIDO, 2009). Em ambientes de cultivo de organismos aquáticos, esse problema torna-se mais grave, pois as cepas bacterianas resistentes, bem como os resíduos de antimicrobianos, podem ser carreados pelos efluentes dos viveiros para rios e estuários, podendo favorecer a disseminação da resistência (BARRAZA-GUARDADO, ARREOLA-LIZARRAGA *et al.*, 2013)

As tetraciclina são antimicrobianos usados principalmente no tratamento de bactérias Gram-negativas e alguns patógenos Gram-positivos. Por serem inibidoras específicas do ribossomo procariótico, esses fármacos são bastante eficientes contra os principais patógenos bacterianos, embora apresentem efeito bacteriostático (DANFER *et al.*,

2014). O uso veterinário de antimicrobianos dessa classe está limitado à tetraciclina, doxiciclina, clortetraciclina e oxitetraciclina. Entretanto, a legalização do uso desses fármacos em cultivo de camarão tem sido questionada (JORGENSEN *et al.*, 2015). Devido à baixa capacidade de absorção e metabolização das tetraciclinas pelo camarão, inúmeros resíduos são gerados no ambiente (ANDERSEN *et al.*, 2005). Além disso, em razão do camarão apresentar um sistema imunológico imune-inato, a administração de antimicrobianos nesses animais tem um efeito apenas instantâneo (PAULING *et al.*, 2014).

Em carcinicultura, os relatos de bactérias com resistência tem aumentado a cada ano, principalmente aos antimicrobianos tetraciclina e oxitetraciclina (AKINBOWALE *et al.*, 2007; TAMMINEN *et al.*, 2011; SUZUKI *et al.*, 2012). Dentre os principais microorganismos com relatos de resistência às tetraciclinas estão aqueles do gênero *Vibrio* (BANERJEE *et al.*, 2012; KITIYODOM *et al.*, 2011; MELO *et al.*, 2011). As bactérias do gênero *Vibrio* são endêmicas do ambiente marinho e estuarino e sua detecção em ambiente de carcinicultura é recorrente (VIEIRA *et al.*, 2010; SHAW *et al.*, 2014).

Cepas com múltipla resistência a antimicrobianos já foram descritas para espécies como *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus* e *V. parahaemolyticus*, que são reconhecidamente patógenos de camarões marinhos cultivados (KITAOKA *et al.*, 2011; PARVATHI *et al.*, 2011). Além disso, cepas multirresistentes de *Vibrio* podem ser veiculadas de organismos cultivados para o homem, quando o pescado é consumido sem cocção ou *in natura* (COSTA *et al.*, 2015; RAISSY *et al.*, 2012). Embora *Vibrio* seja considerado o patógeno oportunista mais comum ao camarão, outras bactérias heterotróficas como *Salmonella*, *Bacillus* e *Aeromonas* também já tiveram relatos de cepas resistentes às tetraciclinas em ambiente de carcinicultura (CARVALHO *et al.*, 2013; SUNDARAMANICKAM *et al.*, 2015).

Algumas cepas de *Vibrio* têm sido relatadas com resistência cruzada às tetraciclinas, principalmente devido a elementos genéticos móveis, tais como plasmídios (NEELA *et al.*, 2007). A detecção de resistência antimicrobiana em *Vibrio* envolve uma série de ensaios bioquímicos, fenotípicos e genotípicos (abordagem polifásica) (DAVIES; DAVIES, 2010). Os ensaios fenotípicos têm a vantagem de avaliar, *in vitro*, a resposta da bactéria quando posta em contato com o agente antimicrobiano (WIUFF *et al.*, 2005). Entretanto, em algumas situações, a resistência pode ser obtida sem qualquer alteração genética, por estratégias como formação de biofilme ou persistência (CORONA; MARTINEZ, 2013).

Com base no que foi exposto, e considerando a importância da atividade de criação de camarão no nordeste brasileiro, a hipótese de trabalho que orienta essa tese é a de que os ambientes de carcinicultura abrigam e mantêm, tanto nos períodos de estio quanto no

chuvoso, uma microbiota bacteriana com resistência às tetraciclinas, da qual as principais representantes são as bactérias do gênero *Vibrio*.

Dessa forma, foi traçado como objetivo geral a avaliação do perfil fenotípico e genotípico da comunidade bacteriana de ambiente de criação de camarão frente aos antimicrobianos das classes das tetraciclinas. Como objetivos específicos, foram considerados: (1) analisar quantitativamente bactérias heterotróficas cultiváveis e com resistência à tetraciclina e oxitetraciclina; (2) identificar a comunidade bacteriana cultivável e com resistência à tetraciclina e a oxitetraciclina; (3) avaliar o perfil de susceptibilidade às tetraciclinas das bactérias do gênero *Vibrio*; (4) determinar a concentração inibitória mínima e bactericida mínima dos antimicrobianos frente às bactérias isoladas, (5) determinar a origem genética da resistência, (6) pesquisar os principais genes que conferem resistência à tetraciclina e oxitetraciclina nos isolados e, a partir dos achados, (7) estabelecer a relação entre a incidência de resistência bacteriana, locais de origem e períodos do ano.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Carcinicultura

A carcinicultura pode ser definida como o cultivo de camarões em águas marinhas, oligohalinas ou de água doce em sistema extensivo, semi-intensivo ou intensivo. No Brasil, a espécie com maior destaque é a *Litopenaeus vannamei*, que é naturalmente encontrada desde a porção leste do Oceano Pacífico (México) até Thumbes, no norte do Peru. A introdução de exemplares desta espécie no Brasil foi de fundamental importância para o desenvolvimento da carcinicultura no país (BARBIERI JUNIOR; OSTRENSKY NETO, 2002, TENÓRIO *et al.*, 2015).

Segundo dados da *Food and Agriculture Organization* (FAO), na última atualização do documento *The State of World Fisheries and Aquaculture*, a produção aquícola ultrapassa o montante de captura para muitas das espécies cultivadas (FAO, 2014). A criação de camarões marinhos contribui em cerca de 55% da produção mundial total (considerando o montante de captura). Nos últimos dados disponibilizados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2014, a produção de camarões no Brasil foi de 65 mil toneladas, das quais 64 mil toneladas foram na região nordeste e 35 mil toneladas no estado do Ceará (maior produtor brasileiro) (IBGE, 2014). No entanto, a maior produção de camarão no mundo se concentra na Ásia, principalmente, na Tailândia (FAO, 2014).

Embora tenha havido crescimento na produção de camarões, no começo da década passada o setor experimentou grandes perdas econômicas devido à ocorrência de doenças de origem viral e bacteriana (ROCHA; LOPES; BORGES, 2009; GAMATI *et al.*, 2015). No Brasil, o vírus da mancha-branca mostrou-se como um patógeno severo ao camarão, causando perdas consideráveis na produção. Além disso, uma vez o camarão infectado pelo vírus, outros micro-organismos oportunistas poderiam invadir o hospedeiro, tais como as bactérias do gênero *Vibrio*. Por algum tempo se acreditou que os víbrios fossem realmente os patógenos primários para camarões cultivados (COSTA *et al.*, 2010).

Nunes *et al.* (2011) ressaltam dois fatores técnicos que contribuíram para recuperação econômica da atividade: (1) retorno do sistema semi-intensivo, com redução das densidades de estocagem de camarões, tratamento do solo por meio de biorremediadores (plantas aquáticas) e (2) continuidade do cultivo de *L. vannamei*, com o devido conhecimento das características fenotípicas e genotípicas da espécie, buscando-se melhoramentos adicionais em algumas empresas.

Ainda assim, a produção aquícola é muito vulnerável aos impactos adversos das condições ambientais e de doenças. Os surtos de viroses e bacterioses nos últimos anos têm afetado a carcinicultura marinha em vários países da Ásia, América do Sul e África, resultando, às vezes, em perda parcial ou total da produção (JONES *et al.*, 2014). Em 2010, a carcinicultura na China sofreu perdas de produção de 1,7 milhões de toneladas causadas por desastres naturais, doenças e poluição. Da mesma maneira, os surtos de doenças praticamente dizimaram a produção da carcinicultura marinha em Moçambique em 2011 (FAO, 2014).

2.2 Comunidade bacteriana de ambiente de aquicultura

A microbiota presente em ambiente de aquicultura reflete a microbiota natural dos corpos hídricos abastecedores. Em cultivo de camarões, nos quais há exigências de salinidade, oxigênio dissolvido e pH controlados, um ou outro grupo bacteriano pode ser mais favorecido. No cultivo de *L. vannamei*, a presença de espécies de bactérias halofílicas está, normalmente, associada à microbiota de estuários e manguezais (PAIVA-MAIA *et al.*, 2013; VANDENBERGHE *et al.*, 1999).

Acredita-se que a maior parte da atividade bacteriana de um viveiro ocorra no sedimento, por apresentar maiores depósitos de matéria orgânica. Nesse contexto, as bactérias nitrificantes assumem importância essencial, pois é sabido que os viveiros de aquicultura podem estar sujeitos ao acúmulo de amônia em níveis tóxicos. Bactérias do gênero *Nitrospira* e *Nitrosococcus* têm sido relatadas em sedimento de viveiros de carcinicultura (PAUNGFOO *et al.*, 2007).

O gênero *Vibrio* corresponde ao grupo bacteriano com maiores relatos de estudos em ambientes de carcinicultura. Além deste, outros gêneros bacterianos comuns são *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Photobacterium* (AL HARBI *et al.*, 2004). O interesse de se analisar a diversidade de bactérias do ambiente de cultivo se dá pela interação que esses micro-organismos têm com os organismos cultivados. Outrossim, avaliar o perfil de virulência dessa comunidade é necessário, principalmente para verificar se de fato fazem parte da microbiota patogênica ou comensal.

Outro fator de relevância está relacionado à microbiota exógena ao ambiente de aquicultura. Gêneros bacterianos como *Salmonella*, *Listeria* ou a espécie *Escherichia coli* têm sido isolados com certa recorrência em ambientes de carcinicultura (CARVALHO *et al.*, 2013; KOONSE *et al.*, 2005; VIEIRA *et al.*, 2010). Esse fato sugere que a microbiota do ambiente de cultivo precisa ser constantemente avaliada.

2.3 *Vibrio*

As bactérias do gênero *Vibrio* são amplamente distribuídas nos corpos hídricos, principalmente, em ambientes marinhos e estuarinos, sendo, inclusive, encontradas em alguns organismos associados a esses ambientes (KEEN, MENDE *et al.*, 2012). A diversidade e abundância de *Vibrio* é dependente das variáveis físico-químicas da água e da sazonalidade (HUQ; SACK *et al.*, 2005). Estes micro-organismos são capazes de sobreviver e de se reproduzir em águas poluídas, com elevada amplitude térmica e de salinidade (CHASE; HARWOOD, 2011). Algumas espécies são intimamente associadas a patologias em seres humanos e em outros organismos, sendo a maioria de vida livre e comensais (NORIEGA-OROZCO *et al.*, 2007; YINGKAJORN; MITRAPARP-ARTHORN *et al.*, 2014).

Atualmente, o gênero *Vibrio* consta de 126 espécies, com representantes isolados de amostras clínicas e ambientais conforme a Coleção Germânica de Micro-organismos (DSMZ, 2016). Segundo Farmer III *et al.* (2005), os micro-organismos pertencentes a esse gênero se caracterizam por serem curvados, ou ligeiramente curvados, com o diâmetro variando entre 0,5 e 0,8 μm e comprimento entre 1,4 e 2,6 μm . Possuem a capacidade de usar a glicose sem produção de gás e, em quase em sua totalidade, são oxidase positivos. São halófilos restritos, necessitando de sódio para o seu crescimento e desenvolvimento.

Embora seja reconhecido o importante papel ecológico de diversas espécies de *Vibrio* na ciclagem de nutrientes no ambiente aquático, algumas cepas de *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae* têm sido relatadas como patógenos oportunistas em camarões marinhos cultivados (VIEIRA *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2013). Em vista disso, a quantificação e identificação de espécies de *Vibrio* com potencial patogênico em ambientes de cultivo de organismos aquáticos têm sido consideradas importantes para o monitoramento ecológico das cepas ambientais (SHINODA; IWASAKI *et al.*, 2010).

Pelo fato de as cepas de *Vibrio* patogênicas representarem risco aos camarões cultivados, a presença desses micro-organismos em carciniculturas resulta em prejuízo financeiro à atividade (CHATTERJEE; HALDAR, 2012). *V. parahaemolyticus* tem sido associado como patógeno causador da Síndrome da Necrose Aguda do Hepatopâncreas (AHPNS) que, na maioria dos casos, leva à mortalidade de todos os camarões acometidos em menos de uma semana (SOTO-RODRIGUEZ *et al.*, 2015). Outras *Vibrioses* ocorrem, principalmente, como infecções secundárias às síndromes virais como da mionecrose infecciosa (IMNV) e da necrose hipodérmica e hematopoiética infecciosa (IHHNV).

Acredita-se que a atividade de carcinicultura costeira influencie a diversidade e quantificação de *Vibrio*, devido à utilização e descarte de água em estuário adjacente (SOUSA et al., 2006). Outrossim, esse descarte de águas residuais, sem tratamento prévio, em águas estuarinas também pode alterar a diversidade da microbiota desse ambiente (BARRAZA-GUARDADO et al., 2013). O aumento da disponibilidade de nutrientes após a desinfecção de viveiros de carcinicultura combinada com uma comunidade microbiana desestabilizada e sem competição aparente favorece bactérias de crescimento rápido tais como *Vibrio* (DE SCHRYVER et al., 2014). Dessa forma, *Vibrio* pode ser considerado um microrganismo de referência para avaliação dos possíveis impactos ambientais decorrentes da atividade de carcinicultura (DETER et al., 2010; TAKEMURA et al., 2014).

2.4 Antimicrobianos

Os antimicrobianos são substâncias naturais ou sintéticas produzidos por bactérias e fungos. Quando administrados, agem sobre bactérias: (1) interrompendo seu crescimento e reprodução (efeito bacteriostático) ou (2) induzindo à morte bacteriana (efeito bactericida ou bacteriolítico) (CHOPRA; ROBERTS; 2001). Esses efeitos ocorrem através da interferência sobre as vias metabólicas, alterando desde a permeabilidade (membrana externa) até a síntese (parede celular, ácido fólico, DNA, RNA e proteínas) bacteriana (PAGES, 2004).

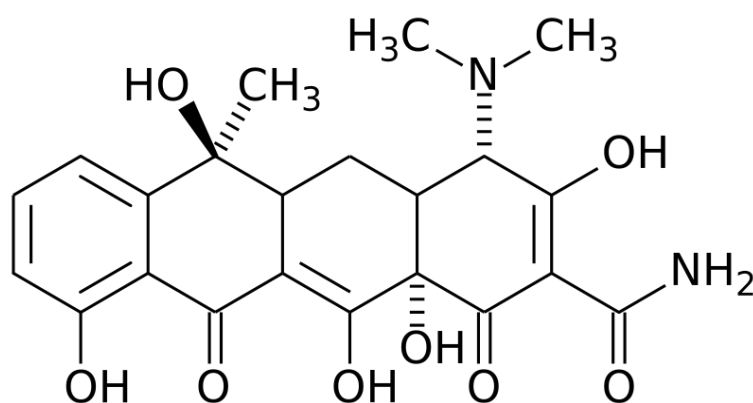
A produção dessas substâncias por micro-organismos esteve sempre associada ao fenômeno de competição e, conseqüente, perpetuação dos micro-organismos no ambiente. O primeiro relato de substância antimicrobiana foi o divulgado pelo britânico Alexander Fleming, o qual verificou que fungos do gênero *Penicillium*, que contaminaram placas com crescimento bacteriano, conseguiram inibir o crescimento destas bactérias. A partir deste evento, inúmeros outros relatos de substâncias com potencial antimicrobianos puderam ser descritas (DEPARDIEU et al., 2007).

Segundo Tavares (2001), as características para o antimicrobiano ser considerado ideal são: (1) ter atividade sobre amplo espectro de micro-organismos; (2) ser absorvido por via oral e parental; (3) ter fácil distribuição pelos tecidos e líquidos orgânicos, atingindo a concentração bactericida pré-estabelecida; (4) não sofrer inativação por enzimas tissulares; (5) não provocar efeitos tóxicos ou alérgicos no hospedeiro; (6) não induzir o desenvolvimento de cepas resistentes; (7) não provocar diminuição da resistência do organismo do hospedeiro; (8) não ter efeitos teratogênicos e (9) ser facilmente obtido em escala industrial e a baixo custo.

2.5 Tetraciclina

Durante os anos 1950 e 1960, a tetraciclina (TET) foi um dos antimicrobianos mais utilizados no mundo e, principalmente, nos Estados Unidos. Nessa época, ela tinha um largo espectro de atividade contra uma ampla diversidade bacteriana, sendo eficaz contra agentes patogênicos intracelulares e extra-celulares. Trata-se de um antimicrobiano com cadeia cíclica (4 ciclos, por isso o nome) e que, por muito tempo, foi difusamente usada por ser relativamente barato e poder ser administrado por via oral (Figura 1) (TRABULSI; ALTHERTUM, 2009).

Figura 1 -Fórmula química estrutural do antimicrobiano tetraciclina.

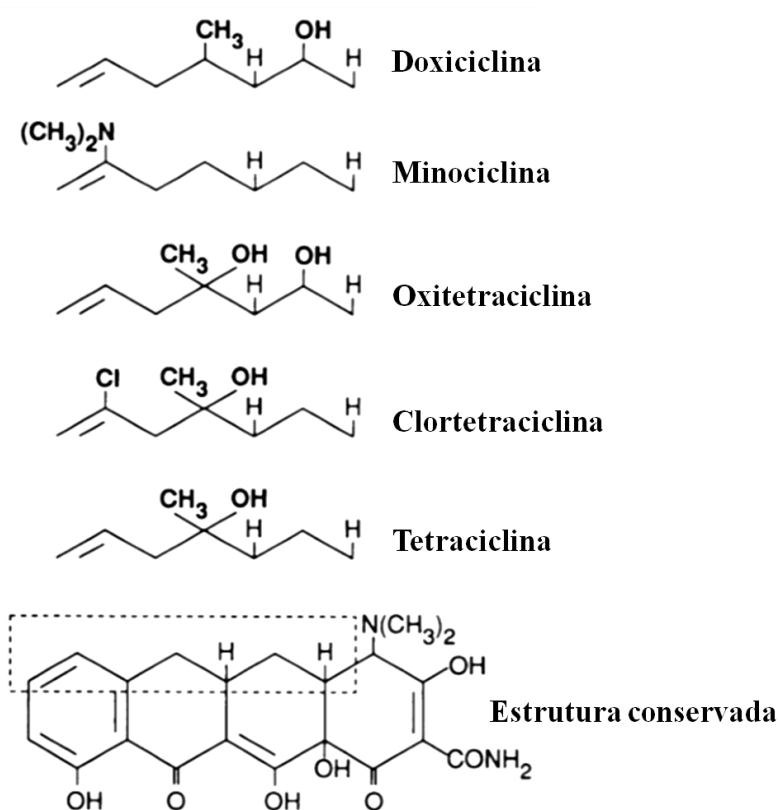


A partir deste fármaco foram relacionados outros antimicrobianos que apresentavam em comum uma estrutura química conservada (Figura 2). Essas substâncias, atualmente, são consideradas da classe das tetraciclina, das quais destacam-se: oxitetraciclina, clortetraciclina, minociclina e doxiciclina (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Originalmente, a tetraciclina recebeu a denominação de "aureomicina" devido à intensa coloração que remetia ao ouro quando produzida por bactérias do gênero *Streptomyces*. Grande parte das tetraciclina são produzidas sinteticamente e seus mecanismos de ação são, amplamente, conhecidos. Esse antimicrobiano se diferencia por ser estritamente bacteriostático e só demonstrar efeito bactericida quando administrado em doses altas (KONEMAN, 2001).

Os antimicrobianos da classe das tetraciclina estão envolvidos na inibição ribossomal (CONNELL *et al.*, 2003; DÖNHÖFER *et al.*, 2012). Estes antimicrobianos são capazes de bloquear o receptor da subunidade 30s ribossomal que se liga ao RNA-t durante a

tradução do gene (LI *et al.*, 2013). No entanto, muitas bactérias têm mecanismos de resistência a esses antimicrobianos, principalmente, devido à utilização na promoção de crescimento e doses sub-terapêuticas para o tratamento de infecções de origem animal (CHOPRA; ROBERTS, 2001).

Figura 2 - Detalhamento da estrutura conservada dos antimicrobianos das classes das tetraciclina.



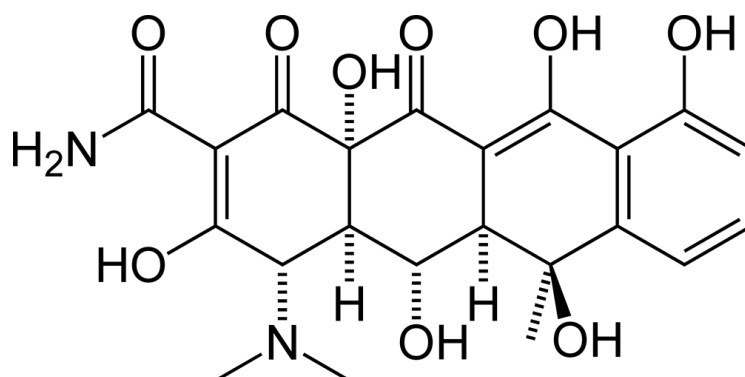
Fonte: SPEER, 1992

A tetraciclina foi gradativamente utilizada em cultivos de organismos, porém sem o devido controle. No Brasil, não há autorização para o uso desse antimicrobiano em cultivo de organismos aquáticos. Em alguns países asiáticos, a tetraciclina é relatada como "promotora de crescimento", embora esse termo seja considerado pela *Food and Drug Administration* (FDA). Relatos de bactérias com resistência a este antimicrobiano são cada vez mais comuns e objetos de inúmeras pesquisas recentes (FABIAN *et al.*, 2014).

2.6 Oxitetraciclina

O antimicrobiano oxitetraciclina (OTC) é um composto pertencente à classe das tetraciclinas, inicialmente encontrado em amostras de solo, sendo produzido pelo actinomiceto *Streptomyces rimosis*. Porém, somente em 1950, o químico Robert Woodward conseguiu sintetizar em laboratório e estabelecer a fórmula química estrutural do composto (Figura 3). As descobertas de Woodward permitiram não só a produção em massa desse antimicrobiano como também a descoberta de outros derivados como: clortetraciclina e doxiciclina, que é um dos fármacos mais popularmente utilizados atualmente (TRABULSI; ALTHERTUM, 2009).

Figura 3 -Fórmula química estrutural do antimicrobiano oxitetraciclina.



Esse fármaco tem sido amplamente utilizado para fins terapêuticos em seres humanos, bem como antimicrobiano promotor de crescimento na criação de animais. Está entre os antimicrobianos mais comumente utilizados em piscicultura no Sudeste Asiático (HOLSTRÖM *et al.*, 2003). Por outro lado, resultados de estudos pretéritos sugerem que esse antimicrobiano pode se bioacumular em vários organismos aquáticos, incluindo invertebrados marinhos e peixes (BAGUER; JENSEN; KROGH, 2000).

A oxitetraciclina é um antimicrobiano de largo espectro amplamente utilizado no tratamento de infecções bacterianas sistêmicas em peixes ósseos cultivados (BJORKLUND; BYLUND, 1991). Foi o primeiro antimicrobiano aprovado pela *United States of Food and Drug Administration* (USFDA) para uso em cultivo de animais exotérmicos. Alguns estudos têm indicado que a oxitetraciclina tem excelente potencial como agente antibacteriano em carcinicultura (WILLIAMS; LIGHTNER, 1988). Embora o uso de OTC não seja, de fato,

aprovado legalmente nos Estados Unidos, seu uso em condições específicas de pesquisas acadêmicas é monitorado pelo *Investigational New Drug Animal* (INAD). Alguns autores ressaltam que a oxitetraciclina tem sido utilizada com sucesso no tratamento de septicemia por *Vibrio* (LIGHTNER, 2005) e hepatopacreatite necrosante (LIGHTNER; REDMAN, 1994).

2.7 Resistência antimicrobiana

A resistência bacteriana a antimicrobianos pode ter origem cromossômica ou ser mediada por plasmídios (COUTINHO *et al.*, 2013). É uma característica intrínseca da bactéria e, quando detectada, assume notável significância na profilaxia terapêutica (DZIDIC *et al.*, 2008; DAVIES; DAVIES, 2010). Em contrapartida, a resistência bacteriana quando mediada por plasmídios representa um risco para saúde pública, pois a transferência desses elementos genéticos móveis para bactérias da mesma espécie ou espécies diferentes aumenta sua disseminação (SVARA E RANKIN, 2011; SCHULTSZ E GEERLINGS, 2012).

O uso intensivo de agentes antimicrobianos é um dos principais fatores para a geração de resistência bacteriana (MARTINEZ, 2009). Atividades de cultivo de organismos marinhos, como carcinicultura, demandam grande quantidade de substâncias antimicrobianas que são erroneamente administradas como promotores de crescimento (BAQUERO *et al.*, 2008; KÜEMMERER, 2009). Além disso, o descarte de águas residuais sem tratamento prévio em águas estuarinas pode alterar a diversidade da microbiota desse ambiente e promover a disseminação da resistência antimicrobiana (BARRAZA-GUARDADO *et al.* 2013).

Segundo Courvalin (1994), a transferência de genes que codificam resistência a antimicrobianos pode ocorrer tanto em bactérias do mesmo gênero, como em gêneros diferentes, independentemente, de serem Gram positivas ou negativas. Ademais, elementos genéticos móveis, tais como plasmídios são, normalmente, associados à disseminação da resistência bacteriana e, por isso, a caracterização da resistência como plasmidial é um problema de saúde pública (BENNETT, 2008).

Os principais mecanismos de resistência em bactérias são: (a) diminuição da absorção ou aumento do efluxo do antimicrobiano, (b) destruição ou modificação do antimicrobiano e (c) alteração do sítio-alvo do antimicrobiano (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005). Algumas cepas bacterianas são produtoras de enzimas β -lactamases de espectro expandido (ESBL) que clivam o anel β -lactâmico de antimicrobianos que o possuem,

inativando-os. O uso de inibidores destas enzimas, como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam tem sido eficiente no tratamento clínico destas cepas produtoras de ESBL, pelos antimicrobianos β -lactâmicos (TAVARES, 2001).

2.8 Detecção de resistência às tetraciclinas

Para detecção de resistência bacteriana às tetraciclinas, pode-se recorrer a testes fenotípicos ou genotípicos. Os testes fenotípicos têm a magnitude de demonstrar *in vitro* a expressão do fenótipo de interesse, enquanto os testes genotípicos são mais específicos e rápidos, mas não garantem que o gene pesquisado seja precisamente expressado (JONES *et al.*, 2009).

O antibiograma, ou teste de susceptibilidade microbiana a antimicrobianos, é o teste fenotípico mais empregado para investigação de fenótipos de resistência. Além disso, a verificação desse fenótipo pode ser realizada a partir de ensaios de macrodiluição ou microdiluição do antimicrobiano em caldo específico (CLSI, 2013).

O método clássico de disco-difusão, proposto por Kirby-Bauer (BAUER; KIRBY; SHERRIS, 1966), baseia-se na capacidade de um antimicrobiano, em uma determinada concentração, difundir-se do disco (no qual foi impregnado) para o ágar com crescimento bacteriano. A formação de uma zona de inibição de crescimento é mensurada (diâmetro) e, a partir desse resultado, a bactéria tem seu perfil de susceptibilidade bacteriana caracterizado em susceptível, intermediário ou resistente. À medida que a substância antimicrobiana se difunde no meio, sua concentração diminui. Dessa forma, quanto menor for o halo de inibição menos susceptível é a cepa e, do contrário, mais susceptível, por isso se considera que o antibiograma é um teste qualitativo (LAOS *et al.*, 2012).

Ao contrário do antibiograma, os testes de macrodiluição ou microdiluição em caldo com concentrações sucessivas do antimicrobiano são considerados testes quantitativos. Esses testes se baseiam na detecção da menor concentração do antimicrobiano que pode inibir o crescimento da bactéria de interesse, sendo essa concentração definida como concentração inibitória mínima (CIM). Assim como no antibiograma, dependendo do valor encontrado da CIM, a bactéria tem seu perfil fenotípico de susceptibilidade antimicrobiana caracterizado (BROSER *et al.*, 2012).

Atualmente, o documento mais difundido acerca da padronização do antibiograma é o proposto pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) que, anualmente, lança atualizações dos antimicrobianos recomendados para cada bactéria-alvo. Além dessa

instituição, o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), padroniza no continente europeu as diretrizes para o antibiograma e, assim como o CLSI, lança documentos anuais com atualizações dos antimicrobianos direcionados para as bactérias de interesse. Embora, ambos os comitês tenham uma vasta importância na pesquisa fenotípica suscetibilidade antimicrobiana, seus interesses são necessariamente clínicos, de forma que as bactérias neles constadas são aquelas de longo conhecimento acerca do seu potencial patogênico a humanos (PAOULI *et al.*, 2014).

Em documento lançado em 2005, e atualizado em 2010, o CLSI incluiu *Vibrio* no rol das bactérias fastidiosas, nas quais a pesquisa de susceptibilidade antimicrobiana fica sujeita aos antimicrobianos da classe das tetraciclina, quinolonas, penicilinas, cefalosporinas e nitrofuranos. Desde o supracitado ano, não houve atualizações para *Vibrio* e, quando necessária a pesquisa de antibiograma para esse gênero, são consideradas as diretrizes desse documento (CLSI, 2010).

A EUCAST não incluiu *Vibrio* nos micro-organismos de interesse, pois considera que essa bactéria não tem histórico de surtos ou patogenicidade recorrente no continente europeu (EUCAST, 2014). Dessa forma, para *Vibrio*, são considerados os padrões de interpretação estabelecidos pelo CLSI. A natureza clínica desses comitês tem feito a comunidade acadêmica escolher o método que seja mais apropriado para detecção da susceptibilidade antimicrobiana de bactérias de origem ambiental, embora uma pequena quantidade dessas tenha importância clínica. Enquanto não há uma unanimidade nesse quesito, os padrões do CLSI são considerados na interpretação.

Para pesquisa de resistência às tetraciclina, são considerados os testes fenotípicos de antibiograma, macro e microdiluição, *E-test* e os genotípicos, pela detecção de genes que expressam resistência a esses fármacos. Como detalhado, os testes de antibiograma e macro e microdiluição em caldo são mais demorados e necessitam que a bactéria entre em contato com a substância antimicrobiana para ter o fenótipo caracterizado. O *E-test* é uma intersecção dos testes de antibiograma e de microdiluição em caldo, pois no ágar com crescimento bacteriano é sobreposta uma fita com diferentes concentrações do antimicrobiano, sendo determinada a CIM (PLIMMER *et al.*, 2009).

A pesquisa dos genes de resistência às tetraciclina é feita através da reação em cadeia pela polimerase (PCR), pela amplificação do gene de interesse. São descritos três mecanismos de resistência às tetraciclina: (1) o efluxo do antimicrobiano, (2) proteínas de proteção ribossomal e (3) a inativação enzimática do fármaco (SPEER; SHOEMAKER; SALYERS, 1992). Todos estes mecanismos são baseados na aquisição de um ou vários

determinantes de resistência à tetraciclina, que estão amplamente distribuídos entre gêneros bacterianos (FABIAN *et al.*, 2014) . Além disso, as mutações no rRNA, sistemas transportadores de multidroga ou barreira de permeabilidade, podem estar envolvidos na resistência a vários antimicrobianos, incluindo as tetraciclinas.

São conhecidos 33 genes de resistência à tetraciclina (*tet*) e três genes diferentes de resistência a oxitetraciclina (*otr*) (SEYFRIED *et al.*, 2010). Neste sentido, um gene *tet* é considerado novo quando o produto do gene mostra uma similaridade de aminoácidos menor que 80 % da proteína Tet (MICHALOVA; NOVOTNA; SCHELEGLOVA, 2004). Não há nenhuma diferença essencial entre os genes *tet* e *otr*, mas os genes de resistência à oxitetraciclina foram descritos pela primeira vez em organismos que produzem esse antimicrobiano, o que se reflete pela nomenclatura (CONNELL *et al.*, 2002).

Com base nos achados de artigos, são considerados 21 genes com reconhecida expressão do mecanismo de efluxo: *tet(A)*, *tet (B)*, *tet (C)* , *tet (D)*, *tet (E)*, *tet (L)*, *tet (H)*, *tet (I)*, *tet (J)*, *tet (K)*, *tet (L)*, *tetA(P)*, *tet (V)*, *tet (Y)*, *tet (Z)*, *tet (30)*, *tet (31)*, *tet (33)*, *tet (34)*, *tet (35)* e pelo gene *otr(B)*. Para o mecanismo de proteínas de proteção ribossomal são relatados os genes: *tet (M)*, *tet (O)*, *tet (S)*, *tet (W)*, *tet (Q)*, *tet (t)*, *tetB(P)*, *tet (32)*, *tet(36)* e o gene *otr(A)* (ROBERTS, 2003). Dois genes, o *tet (X)* e *tet (37)* têm sido relacionados à expressão de enzimas que inativam as tetraciclinas (HUANG *et al.*, 2013; SPEER; SHOEMAKER; SALYERS, 1992).

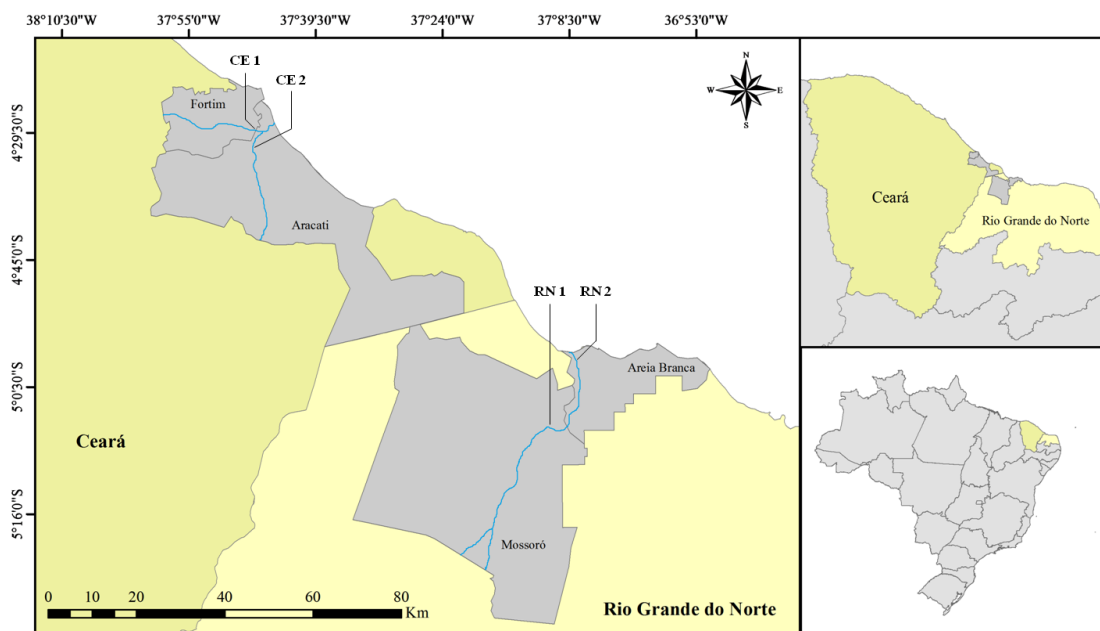
Genes que expressam a capacidade de efluxo do antimicrobiano, tais como *tet(A)* - (E), *tet(L)* e *tet(Y)*, ocorrem com frequência entre bactérias gram-negativas em ambientes de aquicultura (FURUSHITA *et al.*, 2005). Os genes de resistência *tet(M)* e *tet(S)*, que codificam proteínas ribossomais de proteção, também foram encontrados com frequência em bactérias intestinais de peixe e água do mar em locais de maricultura (KIM; NONAKA; SUZUKI, 2004). O gene de resistência *tet(34)* foi encontrado em uma cepa de *Vibrio* isolada de peixes marinhos cultivados. No entanto, esse gene pode ter ocorrência ocasional e distribuição restrita, pois está localizado no DNA cromossômico (KIM; NONAKA; IKENO; SUZUKI, 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e período de coleta

As coletas foram realizadas em quatro (4) fazendas de carcinicultura dos estados do Ceará (Fazendas CE 1 e CE 2) e Rio Grande do Norte (Fazendas RN 1 e RN 2) (Figura 4). A fazenda de carcinicultura CE 1 está situada no município de Fortim, enquanto a fazenda CE 2 no município de Aracati, com conexões (abastecimento e drenagem) ao estuário do Pirangi e Jaguaribe, respectivamente. A fazenda RN 1 está localizada no município de Mossoró, enquanto a fazenda RN 2 no município de Areia Branca, com conexões ao rio Apodi-Mossoró e ao estuário do Apodi, respectivamente.

Figura 4 - Localização das quatro fazendas de carcinicultura nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte.



Para determinação do período de coleta, foram consultados os dados pluviométricos pretéritos (últimos 20 anos) de cada um dos locais de coleta, por mês, da FUNCEME (Ceará) e EMPARN (Rio Grande do Norte), sendo estabelecidos dois períodos de coleta: "estio", meses com menor média pluviométrica, compreendidos de junho a dezembro de 2012 e "chuvoso", com maior média pluviométrica, de janeiro a maio de 2013. Todas as coletas foram realizadas no período da manhã (entre 8:00 e 10:00), com ausência de precipitação no momento da coleta, totalizando oito coletas

(quatro no período considerado de estio e quatro do no período considerado chuvoso).

3.2 Pontos de coleta

Para as coletas, foram considerados pontos externos e internos das fazendas de carcinicultura: estuário (E), canal de abastecimento (CA), viveiro (V) e canal de drenagem (CD). Em cada um dos pontos foram coletadas amostras de água (método de filtração) e de sedimento. Nas fazendas CE 1, RN1 e RN 2 foram possíveis as coletas em todos os pontos, entretanto na fazenda CE 2 não foram possíveis as coletas no canal de abastecimento e no canal de drenagem, pois nesta fazenda de carcinicultura a captação e o descarte da água de cultivo ocorre por canos de policloreto de vinila (PVC).

3.2.1 Amostras de água

Com o auxílio de uma garrafa de vidro de cor âmbar, previamente esterilizada, foram coletados 3 L de água *in situ*. A amostra foi filtrada usando um sistema de filtração adaptado, tendo como elemento filtrante 2 pedaços de gaze (estéril) com 1 m cada. O procedimento foi repetido para cada grupo bacteriológico pesquisado em cada ponto de coleta. Após as etapas de coleta e filtração das amostras, um pedaço de gaze foi imerso em um Erlenmeyer contendo solução salina 1% (p/v) de cloreto de sódio (para isolamento de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis) e outro pedaço de gaze, em um Erlenmeyer contendo Água Peptonada Alcalina 1% (p/v) de Cloreto de sódio (APA 1%) (para isolamento de *Vibrio* spp.) (Etapas de Pré-enriquecimento). Os recipientes foram, de imediato, acondicionados em caixa isotérmica para manutenção.

3.2.2 Amostras de sedimento

As coletas das amostras de sedimento foram realizadas em uma profundidade média de 1 m com o auxílio de um *core sampler*, o qual apresenta um retentor da amostra (em material PVC) acoplado a um suporte de metal com válvula para saída de ar. Após o material ser coletado, foi inserido em um saco plástico com fecho e acondicionado em caixa isotérmica.

3.3. Variáveis físicas e químicas

Em cada coleta foram verificadas as variáveis físicas e químicas para as amostras de água: temperatura (°C), salinidade e pH. A temperatura foi verificada *in situ* com auxílio de um termômetro bastão de mercúrio (Incoterm) até sua estabilização. A salinidade e pH foram determinados em refratômetro digital (Meter 211) e potenciômetro (pH Meter), respectivamente, no laboratório.

3.4 Pesquisa bacteriológica

Após as coletas das amostras, todo material foi transportado em caixas isotérmicas para o Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado - LABOMAR/UFC para os procedimentos de análise bacteriológica. Foram analisados os grupos de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHC) e o gênero específico *Vibrio* spp.

3.4.1 Preparo das amostras de sedimento

Para as amostras de sedimento de cada ponto de coleta, foram pesados 50 g que foram imersos em Erlenmeyer contendo 450 mL de solução salina a 1% (p/v) de cloreto de sódio (correspondendo à diluição de 10^{-1}). O material de cada Erlenmeyer foi submetido à agitação magnética em agitador magnético (Cole Parmer) por 30 min.

3.4.2 Quantificação de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis

3.4.2.1 Preparo das diluições e plaqueamento

Para o preparo das diluições das amostras de sedimento, do Erlenmeyer com sedimento submetido à agitação magnética, foi retirada uma alíquota de 1 mL e diluída em um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina 1%, correspondendo à diluição de 10^{-2} . A amostra foi diluída seriadamente até a diluição de 10^{-8} . Para as amostras de água, o procedimento foi o mesmo com diluição até 10^{-4} . A partir dos tubos de ensaio com diluições salinas, tanto para amostras de água quanto de sedimento, foi retirada uma alíquota de 1 mL colocada em placas de Petri que foram cobertas com Ágar de Contagem em Placas (PCA) (Difco) acrescido de 1% (p/v) de cloreto de sódio e

homogeneizadas através da técnica do *pour plate*. Após, as placas foram incubadas a 35°C por 48 h.

3.4.2.2 Contagem das Unidades Formadoras de Colônias

Após o período de incubação, as colônias foram contadas e as placas com crescimento entre 25 e 250 colônias foram escolhidas para o cálculo das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) das amostras de cada ponto de coleta, segundo recomendações de Sutton (2011). Para água, os valores foram determinados em UFC.mL⁻¹ e para o sedimento, UFC.g⁻¹. Nos casos das placas que não tiveram crescimento dentro do intervalo supracitado, as contagens foram estimadas.

3.4.2.3 Isolamento das colônias

Das placas de escolha para contagem, foram isoladas colônias conforme os critérios de tamanho, coloração e formato, as quais foram inoculadas em tubos de ensaio contendo Ágar Tríplico de Soja acrescido de 1% (p/v) (Difco) de Cloreto de sódio (TSA 1%) e incubadas a 35°C por 24 h. Após, as cepas foram caracterizadas e identificadas fenotipicamente conforme recomendações dos *Bergey's Manual* (2005) e de Koneman *et al.* (2001).

3.4.3 Quantificação de bactérias resistentes às tetraciclinas

Das diluições salinas, detalhadas no item 3.4.2.1, foram retiradas alíquotas de 1 mL e inoculadas em placas de Petri em duas baterias: na primeira foi sobreposto o meio PCA 1% acrescido de 30 µg.L⁻¹ de tetraciclina (Inlab) e na segunda PCA 1% acrescido de 30 µg.L⁻¹ de oxitetraciclina (Cas-For). As placas foram incubadas a 35°C por 48 h. A contagem e isolamento das colônias foi realizada conforme descrito no itens 3.4.2.2 e 3.4.2.3, respectivamente.

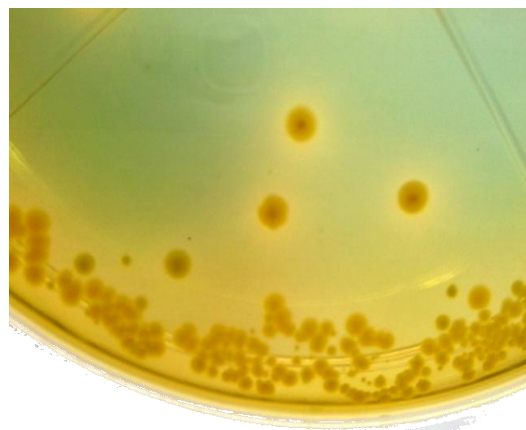
3.4.4 Quantificação de *Vibrio*

Para investigação de *Vibrio* nas amostras de água, foram realizadas diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-6} em APA 1% (p/v) a partir do Erlenmeyer contendo APA 1% com gaze imersa, Para o sedimento, procedeu-se o descrito no item 3.4.2.1. A partir das diluições em APA 1%, foram retiradas alíquotas de 200 μ L e espalhadas sobre a superfície de placas de Petri contendo Ágar Tiosulfato Citrato Bile e Sacarose (TCBS) (Difco) as quais foram incubadas a 35°C por 24 h. Após esse período, as colônias crescidas nas placas foram contadas e aquelas com crescimento entre 25 e 250 colônias foram escolhidas para o cálculo das Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Foram estabelecidas as contagens de *Vibrio* total, *Vibrio* sacarose positivos (Figura 5) e negativos (Figura 6). As colônias suspeitas foram isoladas em TSA 1%, incubadas a 35°C por 24 h, e identificadas fenotipicamente. (KONEMAN *et al.*, 2001).

Figura 5 - Placa de TCBS com *Vibrio* sacarose positivos. **Figura 6** - Placa de TCBS com *Vibrio* sacarose negativos.



Fonte: Próprio autor



Fonte: Próprio autor

3.4.5 Identificação Fenotípica de *Vibrio*

3.4.5.1 Coloração morfotintorial de Gram

As cepas de *Vibrio* isoladas foram repicadas em tubos contendo TSA 1% e incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 24 h. Após esse período, foi feito um

esfregação do inóculo em uma lâmina de vidro. O esfregação foi fixado por calor em bico de Bunsen e submetido às etapas da coloração de Gram. Os esfregaços foram corados com cristal violeta durante 1 min. Após lavagem, os esfregaços foram submetidos ao mordente lugol por 1 min. e descorados em solução de álcool/acetona (1:1). Por último, as lâminas foram coradas com safranina por 20 s. As lâminas que apresentaram células bacterianas Gram negativas (coradas por safranina: cor rósea) na forma de bastonetes curtos, ligeiramente curvados, foram consideradas *Vibrio*.

3.4.5.2 Testes bioquímicos

Para identificação fenotípica de *Vibrio* foram realizados os testes bioquímicos descritos no Quadro 1. As cepas foram previamente crescidas em TSA 1% antes da inoculação (35°C por 24 h.). Todos os meios para os testes bioquímicos tiveram adição de 1% (p/v) de cloreto de sódio, à exceção daqueles em que a concentração do cloreto de sódio estivesse sendo testada.

Quadro 1 - Descrição dos testes bioquímicos para identificação de *Vibrio* das amostras de água e sedimento das fazendas de carcinicultura do nordeste do Brasil.

Teste	Descrição	Meio/Material	Referência
Aminoácidos	Hidrólise da arginina e descarboxilação da lisina e ornitina. Incubação a 35°C por até 7 dias.	Caldo vermelho de metila + aminoácido	KONEMAN <i>et al.</i> , 2001
Carboidratos	Fermentação da sacarose, arabinose, manitol, melibiose e D-glucosamina. Incubação a 35°C por até 7 dias.	Caldo vermelho de metila + carboidrato	VASANTHAKUMARI, 2009
Halofilismo	Crescimento a 1, 3, 6, 8 e 10% de Cloreto de sódio (NaCl) (p/v) por 24 h	Caldo triptona + NaCl	KONEMAN <i>et al.</i> , 2001
Temperatura	Crescimento a 4, 20, 20, 35 e 40°C por 24 h	Caldo triptona	KONEMAN <i>et al.</i> , 2001
Oxidase	Detecção da produção de indofenol (citrocromo-oxidase). Resultado imediato.	Tira comercial com p-fenilenodiamina	VASANTHAKUMARI, 2009
ONPG	Detecção da enzima lactase. Incubação a 35°C por 24 h.	Salina 1% (p/v) + Solução de ONPG	VASANTHAKUMARI, 2009
Indol-Motilidade-H ₂ S	Verificação da produção de indol, motilidade e produção de H ₂ S. Incubação a 35°C por 24 h.	Ágar SIM	VASANTHAKUMARI, 2009
Redução do nitrato	Verificação da redução de nitrito a nitrato. Incubação a 35°C por 24 h.	Ágar Nitrato	KONEMAN <i>et al.</i> , 2001
O/129	Bactérias em contato com discos impregnados com o agente <i>Vibriostático</i> O/129 a 10 µg e 150 µg. Incubação a 35°C por 24 h.	Ágar Mueller-Hinton.	KONEMAN <i>et al.</i> , 2001
Citrato	Utilização do citrato como única fonte de carbono. Incubação a 35°C por 4 dias	Ágar Citrato de Simmons	VASANTHAKUMARI, 2009
Urease	Detecção da enzima urease. Incubação a 35°C por 24 h	Caldo Ureia	VASANTHAKUMARI, 2009

3.4.6 Antibiograma

O antibiograma das cepas de *Vibrio* purificadas foi realizado segundo as recomendações do *Clinical Laboratory and Standards Institute* na 2ª edição do *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria* (CLSI, 2010). O procedimento foi realizado utilizando-se ágar Mueller-Hinton (Difco) acrescido de 1% (p/v) de Cloreto de sódio. Foram utilizadas as cepas-padrão de *Vibrio cholerae* clássico 516B e *Escherichia coli* ATCC 25922 como controles no teste.

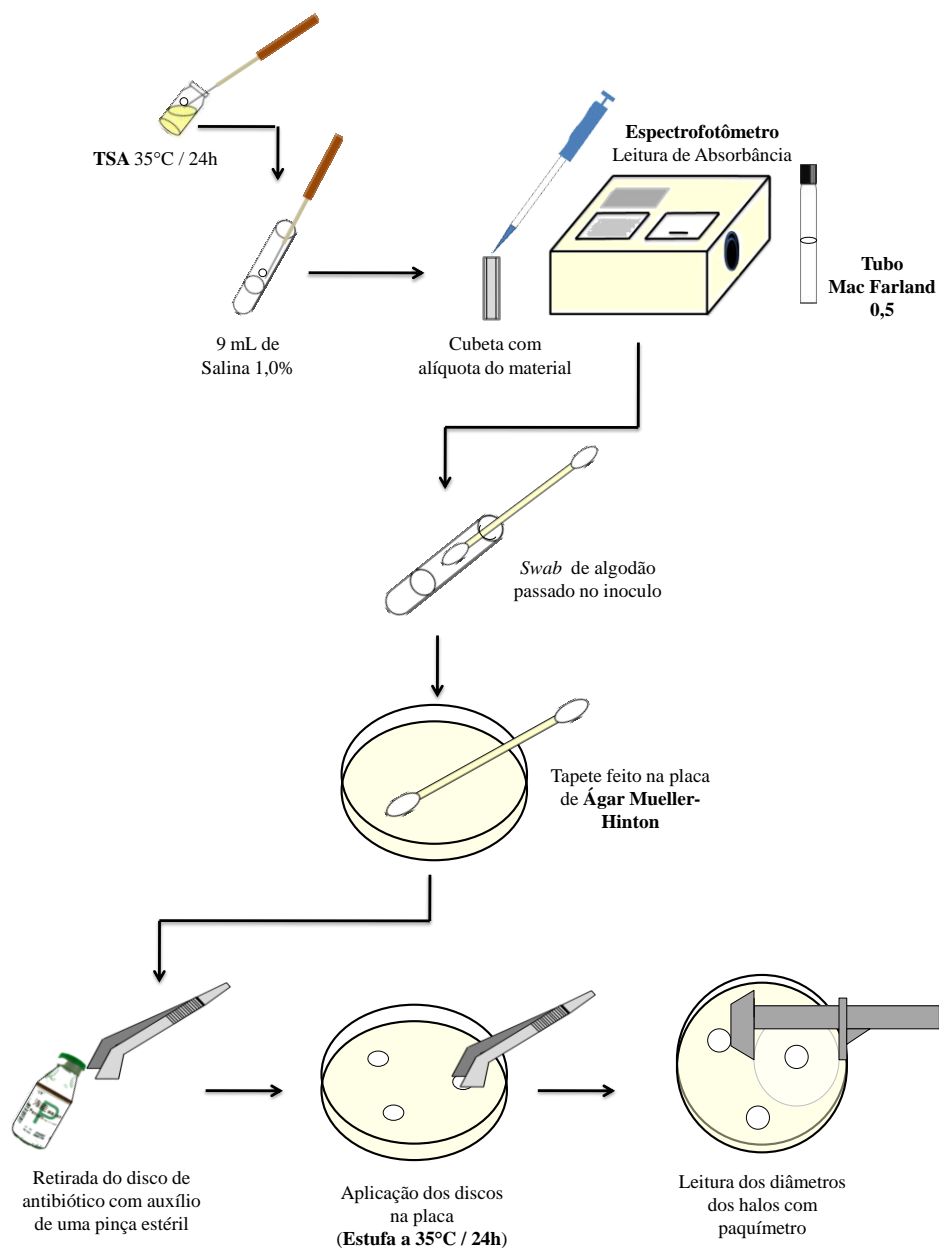
3.4.6.1. Preparo do Inóculo

De culturas crescidas em TSA 1% a 35°C por 24 h, foi retirada uma porção do inóculo e homogeneizada em 9 mL de solução salina 1 % de cloreto de sódio (p/v) (Vetec) até se obter uma turvação equivalente à turbidez 0,5 na escala de McFarland. A absorbância foi aferida em espectrofotômetro (Micronal), sendo considerado o intervalo entre 0,08 e 0,10, em um comprimento de onda de 625 nm. A turbidez óptica comparável à solução padrão 0,5 de McFarland equivale a uma suspensão contendo, aproximadamente, 1×10^8 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC / mL) (CLSI, 2013) (Figura 7).

3.4.6.2. Inoculação nas placas de teste

As cepas com concentrações do inóculo ajustadas foram inoculadas, em duplicata, em placas contendo ágar Mueller-Hinton acrescido de 1% de cloreto de sódio (p/v), solubilizado em água destilada, com auxílio de um *swab* de algodão estéril. As placas foram mantidas fechadas e os discos de antimicrobianos depositados em um período não superior a 15 min. após inoculação (CLSI, 2010) (Figura 7).

Figura 7 – Fluxograma do antibiograma das cepas de *Vibrio* spp.



3.4.6.3. Aplicação dos discos de antimicrobianos

Foi testada a susceptibilidade das cepas de *Vibrio* aos antimicrobianos (Laborclin) das classes das tetraciclina: tetraciclina (TET, 30 µg) e oxitetraciclina (OTC, 30 µg). Os discos de OTC foram confeccionados em laboratório, impregnando-se alíquotas do antimicrobiano em discos brancos (Laborclin) conforme recomendações do CLSI (2010). Os discos de antimicrobianos foram depositados, individualmente, com auxílio de uma pinça estéril na superfície do ágar. Posteriormente à aplicação dos discos, as placas foram invertidas e incubadas em estufa a 35°C por 24 h (Figura 7).

3.4.6.4. Leitura dos halos e interpretação dos resultados

Após o período de incubação, cada placa foi examinada a fim de se verificar se foi satisfatoriamente semeada. A formação de halos, uniformemente circulares, e a presença de um tapete confluyente de crescimento indicaram a inoculação correta. Os halos de inibição total foram mensurados, incluindo o diâmetro do disco. De acordo com o tamanho de cada halo, a cepa foi classificada como sensível (S), intermediária (I) ou resistente (R) ao antimicrobiano testado. O padrão interpretativo do tamanho dos halos, para cada antimicrobiano testado, está detalhado no quadro 2 (CLSI, 2010).

Quadro 2 – Padrão interpretativo das zonas de inibição dos antimicrobianos testados pelo método de Kirby-Bauer.

Antimicrobianos	Símbolo*	Zona de Inibição (mm)			Micro-organismo de referência
		Sensível	Intermediário	Resistente	
Oxitetraciclina	OTC (30 µg)	> 19	15 - 18	≤ 14	<i>Vibrio</i> spp.
Tetraciclina	TET (30 µg)	> 19	15 - 18	≤ 14	<i>Vibrio cholerae</i>

Fonte: CLSI, 2010

*concentração do disco

3.4.7. Cura do plasmídeo

As cepas de *Vibrio* spp. e demais BHC caracterizadas como resistentes aos antimicrobianos testados foram submetidas à cura do plasmídeo pelo agente curagênico *acridine orange* (Sigma), de forma a se verificar a natureza da resistência como potencialmente cromossômica ou plasmidial (MOLINA-AJA *et al.*, 2002; VIEIRA *et al.*, 2010). Culturas puras foram semeadas em tubos contendo caldo Luria Bertani 1% de NaCl (p/v) (LB 1%) acrescido de 100 µg.mL⁻¹ de acridine orange e LB 1% sem adição do agente curagênico (controle), e incubadas a 35°C por 24 h. Após este período, as cepas foram inoculadas em tubos com TSA 1% e incubadas a 35°C por 24 h. O antibiograma das cepas resistentes foi realizado segundo procedimento descrito no item 3.3.1. Caso as cepas permanecessem resistentes ao antimicrobiano testado, essa resistência seria caracterizada como potencialmente cromossômica, ao contrário, plasmidial.

3.4.8 Concentração Inibitória Mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada para todos os isolados de *Vibrio* de demais BHC para os antimicrobianos tetraciclina e oxitetraciclina. Os tubos de caldo Mueller-Hinton (Difco) foram preparados com as concentrações de antimicrobiano a 0 (controle), 2 µg, 4 µg, 8 µg, 16 µg, 32 µg, 64 µg, 128 µg e 256 µg, sem que o volume de antimicrobiano ultrapassasse 40% do volume final no tubo (5 mL). O inóculo padrão inicial foi obtido com base no procedimento descrito no item 3.4.6.1 (p.24), com turbidez semelhante à solução 0,5 na escala de McFarland. Para se obter a concentração final de bactérias do teste CIM, aproximadamente 5×10^5 UFC / mL, o inóculo inicial foi diluído na proporção de 1:10, correspondendo a uma concentração bacteriana de 1×10^7 UFC / mL. Desta diluição foi retirada uma alíquota de 50 µL e inoculada nos tubos, em duplicata, com diferentes concentrações dos antimicrobianos bem como no tubo controle e incubados a 35°C por 24 h. 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 não foi verificada turvação do meio. O padrão interpretativo está detalhado no quadro 3.

Quadro 3 – Padrão interpretativo das concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos antimicrobianos testados pelo método de macrodiluição em caldo.

Antimicrobianos	Símbolo	Concentrações (µg/mL)			Micro-organismo de referência
		Sensível	Intermediário	Resistente	
Oxitetraciclina	OTC	≤ 4	8	≥ 16	<i>Vibrio</i> spp.
Tetraciclina	TET	≤ 4	8	≥ 16	<i>Vibrio cholerae</i>

Fonte: CLSI, 2010

3.4.9 Concentração Bactericida Mínima

Para determinação da concentração bactericida mínima (CBM), foi retirada uma alíquota de 1 mL de cada um dos tubos de caldo MH 1% (os mesmos usados para

determinação do MIC) e inoculados em placas de Petri nas quais foi sobreposto ágar MH 1% (*pour plate*). Após a solidificação dos meios, as placas foram invertidas e incubadas a 35°C por 24 h. Foi considerado CBM a menor concentração das placas sem crescimento aparente de colônias bacterianas viáveis (BATICADOS *et al.*, 1990).

3.4.10 Índice de diversidade e dominância

Para cada local de coleta, foram determinados os índices de diversidade de Shannon-Weaver (H') e de dominância de Simpson (C) conforme equações 1 e 2 respectivamente (HILL *et al.*, 2003). Os índices H' e C também foram determinados entre as espécies de *Vibrio* por período (estio e chuvoso) e entre as amostras de água e sedimento.

$$H' = - \sum_{i=1}^s pi \ln pi \quad (1)$$

Na qual: H' = Índice de Shannon-Weaver; pi = abundância relativa (proporção) da espécie i na amostra, ni = número de indivíduos da espécie i, N= Número de indivíduos total da amostra.

$$C = 1 - \frac{\sum_{i=1}^s ni(ni - 1)}{N(N - 1)} \quad (2)$$

Na qual: C = índice de dominância de Simpson; ni = número de indivíduos amostrados da i-ésima espécie; N= número total de indivíduos amostrados.

3.4.11 Análise estatística

3.4.11.1 Diferença das contagens nos períodos e pontos de coleta

Inicialmente, todos os resultados de contagens de BHC, BHC+TET, BHC+OTC e *Vibrio* total, por ponto de coleta e período, foram submetidos à estatística descritiva básica (média e desvio padrão), a fim de verificar se os dados apresentavam os requisitos de distribuição normal, homocedasticidade e se eram independentes. Foram calculados as médias desvios padrões a partir das contagens bacterianas obtidas para cada grupo analisado (BHC total, BHC+TET, *Vibrio* total, *Vibrio* sacarose positivo, *Vibrio* sacarose negativo). Para isso foi utilizado o programa estatístico Statsoft

Statística 7.0. Uma vez sendo obedecidos os requisitos, os dados foram submetidos a testes de estatística paramétrica e, caso contrário, de estatística não-paramétrica. A análise da diferença estatística da contagens de BHC, BHC+TET, BHC+OTC, *Vibrio* total, *Vibrio* sacarose positivo e *Vibrio* sacarose negativo entre os períodos de estio e chuvoso (água e sedimento) e para os pontos de coleta estuário, canal de abastecimento, viveiro e canal de drenagem foi realizada utilizando-se análise de variância, considerando-se $\alpha=5\%$.

3.4.11.2 Diferença no tamanho dos halos de inibição bacterianos

Os valores, em mm, dos halos de inibição de crescimento de *Vibrio*, frente à tetraciclina e oxitetraciclina, foram submetidos à estatística descritiva básica. Sendo obedecidos os requisitos detalhados no item 3.4.10.1, os valores dos halos foram submetidos: (a) à ANOVA ($\alpha=5\%$), para verificação da possível diferença no tamanho dos halos inibição para as cepas isoladas dos pontos de coleta estuário, canal de abastecimento, viveiro e canal de drenagem; e (b) ao teste t de Student ($\alpha=5\%$), para verificação da diferença tamanho dos halos inibição para as cepas isoladas nos períodos de estio e chuvoso.

3.4.11.3 Temperatura, salinidade e pH

A análise da diferença estatística entre as variáveis físicas e químicas temperatura, salinidade e pH foi feita considerando-se os pontos e períodos de coleta, utilizando-se ANOVA a ($\alpha=5\%$). Após, foi realizada correlação canônica entre as variáveis físico-químicas (variáveis independentes) e as contagens bacterianas (variáveis dependentes), considerando-se $\alpha=5\%$.

*3.4.11.4 Diversidade de *Vibrio* e demais bactérias heterotróficas cultiváveis*

Para a análise da diversidade de *Vibrio* e demais bactérias heterotróficas cultiváveis foi utilizado o teste multivariado de análise de correspondência. Foi considerada a frequência para cada gênero bacteriano encontrado (ou espécies de *Vibrio*, no caso específico deste gênero) para cada combinação de período/amostra/ponto de coleta. Para cada combinação foi atribuído um código, o qual foi considerado para

elaboração dos mapas de percepção conforme quadro 4. Os testes foram realizados no programa estatístico StatSoft Statistica 7.0.

Quadro 4 - Códigos das combinações período/amostra/ponto de coleta para cada grupo bacteriano analisado.

Códigos				Combinação
BHC	BHC+TET	BHC+OTC	<i>Vibrio</i>	
A01	B01	C01	D01	Chuvoso/Água/Estuário
A02	B02	C02	D02	Chuvoso/Água/Canal de Abastecimento
A03	B03	C03	D03	Chuvoso/Água/Viveiro
A04	B04	C04	D04	Chuvoso/Água/Canal de Drenagem
A05	B05	C05	D05	Chuvoso/Sedimento/Estuário
A06	B06	C06	D06	Chuvoso/Sedimento/Canal de Abastecimento
A07	B07	C07	D07	Chuvoso/Sedimento/Viveiro
A08	B08	C08	D08	Chuvoso/Sedimento/Canal de Drenagem
A09	B09	C09	D09	Estio/Água/Estuário
A10	B10	C10	D10	Estio/Água/Canal de Abastecimento
A11	B11	C11	D11	Estio/Água/Viveiro
A12	B12	C12	D12	Estio/Água/Canal de Drenagem
A13	B13	C13	D13	Estio/Sedimento/Estuário
A14	B14	C14	D14	Estio/Sedimento/Canal de Abastecimento
A15	B15	C15	D15	Estio/Sedimento/Viveiro
A16	B16	C16	D16	Estio/Sedimento/Canal de Drenagem

3.5 Análise genotípica

3.5.1 Extração do DNA genômico

As cepas puras de *Vibrio* e demais BHC, com fenótipo de resistência à tetraciclina e oxitetraciclina, foram crescidas em tubos de ensaio contendo 5 mL de TSB 1% e incubadas a 37°C por 24 h. Após esse período, uma alíquota de 2 mL foi transferida para tubos de microcentrífuga, congeladas em freezer a -20°C por 30 min. e centrifugadas a 5.000×g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e as células bacterianas (no *pellet*) foram lavadas com água destilada estéril e centrifugadas novamente a 5.000×g por 5 min. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi descartado, sendo as células bacterianas ressuspensas em 500 µL de tampão de extração (0,15 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, SDS 2%, pH 8,0) acrescido de lisozima (10 mg/mL) e incubadas em banho-maria a 65°C por 1 h. Após, para cada tubo com amostra, foram acrescidos 500 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) gelado e 500

μL de acetato de potássio 0,5 M gelado. O material foi centrifugado a 10.000×g por 15 min. O sobrenadante foi coletado e transferido para outro tubo de microcentrífuga estéril, no qual foi adicionado o mesmo volume de álcool isopropílico gelado, sendo o tubo centrifugado a 10.000×g por 15 min. Após, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado um volume (o mesmo volume da etapa anterior) de álcool etílico 80%. Os tubos foram centrifugados (10.000×g por 15 min.), o sobrenadante descartado e o *pellet* (com DNA extraído) seco em temperatura ambiente por 24 h. O DNA foi ressuspenso em tampão de eluição (10 mM de Tris-HCl, 1mM de EDTA, pH 8,0) e estocado a -20°C (SAMBROOK; FRITSCHI; MANIATIS, 1989).

3.5.2 Quantificação e verificação da pureza do DNA extraído

A quantificação do DNA foi verificada em aparelho NanoDrop (Thermo) modelo 1000. Para isso, foi realizada a quantificação de 1,5 μL da amostra de DNA no comprimento de onda de 280 nm (padrão para proteína) e, depois, a 260 nm (padrão para DNA). A razão das quantificações realizadas a 260 nm e 280 nm deveria ser inferior a 1,8 para que se considerasse a amostra com DNA em condições satisfatórias de pureza (livre de proteínas) para o uso.

3.5.3 Amplificação das sequências de DNA de interesse

3.5.3.1 Gênero *Vibrio*

Para confirmação da identificação fenotípica das cepas de *Vibrio*, foi realizada amplificação, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), do DNA extraído. Para isso, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) *vib727-F* (5'-AGG CGG CCC CCT GGA CAG A-3') e *vib1423-R* (5'-RCT TCT KKT GCA GCC CAC TCC CA-3') sob as condições de termociclagem em 30 ciclos: desnaturação a 94°C por 1 min., anelamento a 57°C por 1 min., extensão 72°C por 5 min. e, após, uma extensão final a 72°C por 30 min, devendo ser gerados amplicons de 650 pb (SOUSA *et al.*, 2006). Os volumes de todos reagentes da reação de PCR são detalhados no quadro 5. A amplificação da reação foi realizada em termociclador ApliTherm modelo TX96.

3.5.3.2 Genes de resistência à tetraciclina e oxitetraciclina

Foi verificada a presença dos genes de resistência à tetraciclina: *tet* (M) e *tet* (S) e à oxitetraciclina: *otr* (A) e *otr* (B) das amostras de DNA extraído de *Vibrio* e demais BHC. Os volumes de todos os reagentes da reação de PCR são detalhados no quadro 5 e as condições de termociclagem para genes de resistência à tetraciclina e oxitetraciclina, respectivamente, nos quadros 6 e 7.

Quadro 5 - Volumes dos reagentes da reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Reagente	Volume	Concentração Final
Tampão 10×	2,4 µL	-
MgCl ₂	0,4 µL	
dNTP	0,2 µL	200 µM
Primer senso (<i>Forward</i>) <i>vib</i> -F, <i>tet</i> (M)-F, <i>tet</i> (S)-F, <i>otr</i> (A)-F ou <i>otr</i> (B)-F	0,2 µL	0,5 µM
Primer antisenso (<i>Reverse</i>) <i>vib</i> -R, <i>tet</i> (M)-R, <i>tet</i> (S)-R, <i>otr</i> (A)-R ou <i>otr</i> (B)-R	0,2 µL	0,5 µM
<i>Taq</i> polimerase	0,2 µL	0,2 U
Amostra de DNA	1 µL	100 ng/µL
Água ultrapura	q.s.p 25 mL	-

Quadro 6 - Condições da Reação em Cadeia pela polimerase (PCR) para os genes *tet* (M) e *tet* (S) para as cepas de *Vibrio* com resistência fenotípica à tetraciclina.

Gene	Sequência	Condições de Termociclagem	Tamanho do amplicon	Referência
<i>tet</i> (M)	F - 5'-GTAAATAGTGTTCTTGGAG-3' R - 5'-CTAAGATATGGCTCTAACAA-3'	25 ciclos Desnaturação: 95°C por 30 s Anelamento: 56°C por 30 s Extensão: 72°C por 1 min. Extensão Final: 72°C por 5 min.	656 pb	KIM; NONAKA; SUZUKI (2004)
<i>tet</i> (S)	F - 5'-CATAGACAAGCCGTTGACC-3' R - 5'-ATGTTTTTGGAACGACAGAG-3'	25 ciclos Desnaturação: 95°C por 30 s Anelamento: 59°C por 30 s Extensão: 72°C por 1 min. Extensão Final: 72°C por 5 min.	667 pb	KIM; NONAKA; SUZUKI (2004)

Quadro 7 - Condições da Reação em Cadeia pela polimerase (PCR) para os genes *otr(A)* e *otr(B)* para as cepas de *Vibrio* com resistência fenotípica à oxitetraciclina.

Gene	Sequência	Condições de Termociclagem	Tamanho do amplicon	Referência
<i>otr(A)</i>	F - 5'-GAACACGTACTGACCGAGAAG-3' R - 5'-CAGAAGTAGTTGTGCGTCCG-3'	Desnaturação inicial: 94°C por 4 min. 35 ciclos Desnaturação: 94°C por 1 min. Anelamento: 55°C por 1 min. Extensão: 72°C por 2 min. Extensão Final: 72°C por 10 min.	778 pb	NIKOLAKOPOULOU <i>et al.</i> (2005)
<i>otr(B)</i>	F - 5'- CCGACATCTACGGGCGCAAGC-3' R - 5'- GGTGATGACGGTCTGGGACAG-3'	Desnaturação inicial: 94°C por 4 min. 35 ciclos Desnaturação: 94°C por 1 min. Anelamento: 55°C por 1 min. Extensão: 72°C por 2 min. Extensão Final: 72°C por 10 min.	947 pb	NIKOLAKOPOULOU <i>et al.</i> (2005)

3.5.4 Eletroforese

A confirmação da amplificação correta do DNA de interesse (gênero *Vibrio* e genes de resistência à tetraciclina e oxitetraciclina) foi verificada por meio da eletroforese em gel de agarose 1% (p/v). Para isso, foi preparado um mix pela adição de 2 µL do corante Blue Juice, 1 µL do intercalante GelRed™, 1 µL de Tampão de corrida Acetato-EDTA (TAE 1X) e 1 µL da amostra de DNA amplificado. O mix, com cada amostra, foi aplicado nos poços do gel de agarose, o qual foi submetido à corrida com voltagem de 100 V por 1 h. Para determinação do tamanho do amplicon, foi aplicado no primeiro poço um marcador 1 kb (DNA Ladder). Após a corrida, o gel foi fotodocumentado em sistema EDAS 120 (Kodak) para análise.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Temperatura, salinidade e pH

A temperatura da água variou de 25 a 32°C, enquanto o pH apresentou valores de 7,10 a 9,07 e a salinidade de 0 a 58 (Tabela 1). Embora a amplitude de variação tenha sido alta para a variável salinidade, esses valores estão dentro dos limites para o crescimento dos gêneros bacterianos mais comuns em regiões tropicais (APPLE; SMITH, BOYD, 2008). Contudo, o fato de as amostras de água dos quatro pontos de coleta da Fazenda CE 1 terem apresentado valores de apenas 1 para a salinidade de suas águas pode ter sido um fator determinante para o não isolamento de espécies halofílicas das amostras de água e sedimento dessa fazenda.

Segundo Awata *et al.* (2012), as bactérias heterotróficas de ambiente marinho e estuarino têm seu crescimento otimizado conforme variações de alguns elementos do próprio ambiente. Dessa forma, a mensuração de variáveis físico-químicas é de primária importância em estudos bacteriológicos para avaliação da microbiota do ambiente, principalmente, pelo potencial seletivo que elas exercem sobre esses organismos (LARSEN *et al.*, 2004). Para Kimes *et al.* (2002), bactérias do gênero *Vibrio* podem crescer em temperaturas entre 4 e 43°C, com ótimo de crescimento a 37°C. Nesses casos, os ecossistemas tropicais do atlântico norte ganham destaque, pois esses ambientes são caracterizados por temperaturas médias altas (28 a 35°C) e com baixa amplitude térmica anual. Nesse contexto, espera-se que a variável temperatura não seja, de fato, seletiva para diversidade bacteriana encontrada no presente estudo, considerando a baixa amplitude térmica encontrada na região de amostragem.

Após realização de análise estatística entre cada variável físico-química, dos pontos de coleta das quatro fazendas de carcinicultura (Tabela 1), não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre as variáveis temperatura e pH no experimento ($p > 0,05$). Entretanto, para a variável salinidade, houve diferença estatisticamente significativa entre os períodos de estio e chuvoso para o ponto de coleta "viveiro". Kolm e Absber (2008) ressaltam que a pluviosidade exerce grande efeito na diversidade da microbiota do ambiente marinho e estuarino devido a variação de salinidade. Além disso, Arana (1999) considera que, ao contrário do que ocorre nos ecossistemas temperados, não é observada estratificação térmica nas regiões tropicais, embora durante a época de maiores pluviosidades ocorra alteração nos padrões de salinidade e matéria orgânica dissolvida.

Tabela 1 - Valores das variáveis ambientais para amostras de água nos pontos de coleta analisados, durante o período de estio e chuvoso, nas fazendas de carcinicultura analisadas.

Local		Estuário			Canal de Abastecimento			Viveiro			Canal de Drenagem		
		T(°C)	S	pH	T(°C)	S	pH	T(°C)	S	pH	T(°C)	S	pH
Estio	CE 1	31	1	8,50	30	1	8,20	31	1	8,36	31	1	8,21
	CE 2	29	45	8,22	*	*	*	28	58	8,47	*	*	*
	RN 1	28	32	7,10	28	30	7,28	28	35	7,40	28	0	9,07
	RN 2	27	40	8,29	26	21	7,76	27	43	8,82	26	23	8,50
Chuvoso	CE 1	29	1	8,00	25	1	8,00	30	0	8,50	30	2	8,10
	CE 2	30	6	7,98	*	*	*	31	7	8,51	*	*	*
	RN 1	32	5	7,60	29	27	7,20	32	14	7,60	32	32	7,30
	RN 2	31	6	7,70	31	37	7,50	31	42	8,20	31	42	7,90
Média		29,00 ^a	28,33 ^b	7,86 ^d	27,88 ^a	25,50 ^b	7,67 ^d	29,11 ^a	32,56 ^c	8,09 ^d	29,25 ^a	25,00 ^b	8,09 ^d
Desvio-Padrão		2,18	19,94	0,43	2,30	17,02	0,34	2,26	22,02	0,49	2,31	21,84	0,53
CV (%)		7,52	70,39	5,53	8,23	66,75	4,41	7,77	67,63	5,99	7,91	87,37	6,56

T: Temperatura; S: Salinidade; CV: Coeficiente de Variação

CE: Fazendas do Ceará 1 e 2, RN: Fazendas do Rio Grande do Norte 1 e 2

*não foi realizada coleta, pois a fazenda CE 2 não apresentava canal de abastecimento e canal de drenagem.

Letras iguais: médias estatisticamente iguais ($p > 0,05$). Letras diferentes: médias estatisticamente diferentes ($p < 0,05$)

4.2 Quantificação e diversidade de bactérias heterotróficas

As contagens de bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC) para os quatro pontos de coleta analisados das fazendas CE 1, CE 2, RN 1 e RN 2 apresentaram baixa amplitude total de variação no período de estio e no chuvoso (Tabelas 2 a 5). Para as amostras de água, os maiores valores de contagens de BHC foram encontrados para o viveiro ($1,4 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹ est.) da fazenda CE 1 (Tabela 4), enquanto para o sedimento, no canal de drenagem ($1,7 \times 10^8$ UFC.g⁻¹ est.) da fazenda RN 1 (Tabela 5) durante o período de estio. Nos pontos de coleta estuário e viveiro, foram quantificadas BHC menores que 1×10^2 UFC.mL⁻¹/g⁻¹ para as amostras de água e sedimento (Tabelas 2 e 4). Embora na literatura seja relatado que há uma intrínseca relação entre a pluviosidade e a quantificação bacteriana, acredita-se que essa diferença seria mais precisa com a avaliação da diversidade (da microbiota) presente nos diferentes pontos de coleta (THOMPSON *et al.*, 2004).

Na quantificação de bactérias heterotróficas cultiváveis com resistência à tetraciclina (BHC+TET) foram encontrados valores máximos de 3×10^5 UFC.mL⁻¹ est. para as amostras de água do viveiro da fazenda RN 1, durante o período chuvoso, e $1,6 \times 10^4$ UFC.g⁻¹ para as amostras de sedimento do estuário e viveiro também durante o período chuvoso, respectivamente das fazendas CE 2 e CE 1 (Tabela 4). Em pelo menos um dos pontos de coleta foram verificadas contagens bacterianas inferiores a 1×10^2 UFC.mL⁻¹/g⁻¹. Com a quantificação de BHC+TET foi possível verificar que há uma microbiota resistente com contagens próximas às encontradas para BHC totais (sem adição de antimicrobiano ao meio de cultura). Para as quantificações de bactérias heterotróficas cultiváveis com resistência à oxitetraciclina (BHC+OTC) foram encontrados valores máximos de $3,1 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹ est. para as amostras de água do viveiro durante o período chuvoso da fazenda RN 2 (Tabela 4) e $3,3 \times 10^4$ UFC.g⁻¹ para amostras de sedimento do viveiro da fazenda RN 1 também durante o período chuvoso (Tabela 4). Assim como ocorreu para BHC+TET, também foram verificados em, pelo menos um dos pontos de coleta, contagens inferiores a 1×10^2 UFC.mL⁻¹/g⁻¹.

Para o ponto de coleta "estuário", as contagens de BHC totais foram estatisticamente superiores às contagens de BHC+TET e BHC+OTC ($F=7,798$, $p<0,05$) para todos os tratamentos (por período e por local de coleta) (Tabela 2). As contagens de BHC+TET e BHC+OTC entre o período de estio e chuvoso, para as amostras de água, foram estatisticamente iguais ($p>0,05$). Entretanto, para as amostras de sedimento, as contagens de BHC+TET e BHC+OTC durante o período de estio foram estatisticamente inferiores às contagens do período chuvoso ($p<0,05$).

Tabela 2 - Contagem Padrão em Placas (CPP) das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por g ou mL de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis nas fazendas de carcinicultura analisadas no ponto de coleta "estuário" no período de estio e chuvoso.

Ponto de coleta	Estio			Chuvoso			
	BHC	BHC+TET	BHC+OTC	BHC	BHC+TET	BHC+OTC	
Água	CE 1	9×10^7	$2,3 \times 10^2$ est	1×10^3 est	$1,5 \times 10^5$ est	$<1 \times 10^2$ est	5×10^2 est
	CE 2	$5,5 \times 10^7$ est	$1,7 \times 10^3$ est	$<1 \times 10^2$ est	$1,6 \times 10^5$	$3,1 \times 10^3$	$2,2 \times 10^4$
	RN 1	$2,7 \times 10^5$ est	$<1 \times 10^2$ est	$3,3 \times 10^3$	$2,5 \times 10^6$ est	3×10^5 est	$1,9 \times 10^3$ est
	RN 2	$4,5 \times 10^6$	$2,5 \times 10^3$ est	$<1 \times 10^2$ est	$4,4 \times 10^6$ est	$4,5 \times 10^4$ est	$<1 \times 10^2$ est
	Média	$3,7 \times 10^7$ ^a	$1,2 \times 10^3$ ^b	$1,2 \times 10^3$ ^b	$1,8 \times 10^6$ ^a	$8,7 \times 10^4$ ^b	$6,2 \times 10^3$ ^b
Sedimento	CE 1	$4,8 \times 10^5$	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	1×10^6	$2,8 \times 10^4$	$3,5 \times 10^2$ est
	CE 2	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	$2,1 \times 10^6$	$1,6 \times 10^4$	$5,7 \times 10^3$
	RN 1	$1,4 \times 10^5$ est	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	5×10^2 est
	RN 2	2×10^4 est	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	5×10^4 est	$1,5 \times 10^3$ est	5×10^2 est
	Média	$1,6 \times 10^5$ ^a	$<1,0 \times 10^2$ ^c	$<1,0 \times 10^2$ ^c	$5,0 \times 10^4$ ^a	$1,5 \times 10^3$ ^b	$5,0 \times 10^2$ ^b

CE: Fazendas do Ceará 1 e 2, RN: Fazendas do Rio Grande do Norte 1 e 2. Letras iguais: Valores médios estatisticamente iguais ($P > 0,05$). Letras diferentes: Valores médios estatisticamente diferentes. ($P < 0,05$).

Tabela 3 - Contagem Padrão em Placas (CPP) das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por g ou mL de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis nas fazendas de carcinicultura analisadas no ponto de coleta "canal de abastecimento" no período de estio e chuvoso.

Ponto de coleta	Estio			Chuvoso			
	BHC	BHC+TET	BHC+OTC	BHC	BHC+TET	BHC+OTC	
Água	CE 1	$9,5 \times 10^5$	3×10^2 est	$1,5 \times 10^2$ est	8×10^4 est	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est
	RN 1	$1,9 \times 10^7$	$1,5 \times 10^5$ est	$1,5 \times 10^2$ est	$1,4 \times 10^5$ est	$2,9 \times 10^4$ est	$3,1 \times 10^4$
	RN 2	2×10^8	2×10^3 est	$<1 \times 10^2$ est	$1,2 \times 10^7$	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est
	Média	$6,7 \times 10^7$ ^a	$5,1 \times 10^4$ ^b	$1,3 \times 10^2$ ^b	$4,1 \times 10^6$ ^a	$9,7 \times 10^3$ ^b	$1,1 \times 10^4$ ^b
Sedimento	CE 1	$3,1 \times 10^4$	3×10^2 est	$<1 \times 10^2$ est	8×10^4 est	$<1 \times 10^2$ est	5×10^2 est
	RN 1	$3,4 \times 10^6$ est	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	$1,8 \times 10^5$	$1,9 \times 10^3$ est	4×10^2 est
	RN 2	$6,6 \times 10^7$	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	5×10^4 est	3×10^3 est	$<1 \times 10^2$ est
	Média	$2,3 \times 10^7$ ^a	$1,6 \times 10^2$ ^b	$<1,0 \times 10^2$ ^b	$1,1 \times 10^5$ ^a	$1,6 \times 10^4$ ^b	$3,3 \times 10^2$ ^b

CE: Fazendas do Ceará 1, RN: Fazendas do Rio Grande do Norte 1 e 2. Fazenda CE 2 não apresentou canal de abastecimento, portanto não foi incluída. Letras iguais: Valores médios estatisticamente iguais ($P > 0,05$). Letras diferentes: Valores médios estatisticamente diferentes. ($P < 0,05$).

Para o ponto de coleta "canal de abastecimento", todas as contagens de BHC totais foram estatisticamente superiores às contagens de BHC+TET e BHC+OTC ($F=9,361$,

$p < 0,05$) (Tabela 3). As contagens de BHC+TET e BHC+OTC foram estatisticamente iguais entre todos os tratamentos (tanto por período de coleta quanto por local de coleta ($p > 0,05$)).

Tabela 4 - Contagem Padrão em Placas (CPP) das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por g ou mL de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis nas fazendas de carcinicultura analisadas no ponto de coleta "viveiro" no período de estio e chuvoso.

Ponto de coleta	Estio			Chuvoso			
	BHC	BHC+TET	BHC+OTC	BHC	BHC+TET	BHC+OTC	
Água	CE 1	$1,4 \times 10^9$ est	$<1 \times 10^2$ est	$1,9 \times 10^3$ est	$2,5 \times 10^6$ est	$2,6 \times 10^5$ est	$1,6 \times 10^3$ est
	CE 2	1×10^7 est	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	$2,6 \times 10^5$	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est
	RN 1	2×10^8 est	4×10^2 est	$2,5 \times 10^5$ est	$4,5 \times 10^6$ est	$4,1 \times 10^4$ est	1×10^5
	RN 2	$8,5 \times 10^8$	$6,1 \times 10^4$ est	$9,6 \times 10^4$	$1,4 \times 10^8$	$2,9 \times 10^5$ est	$3,1 \times 10^5$ est
	Média	$6,1 \times 10^8$ ^a	$1,5 \times 10^4$ ^b	$8,7 \times 10^4$ ^b	$3,6 \times 10^7$ ^{ac}	$1,4 \times 10^5$ ^b	$1,1 \times 10^5$ ^b
Sedimento	CE 1	$6,1 \times 10^4$	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	$3,6 \times 10^5$ est	$1,6 \times 10^4$	$2,2 \times 10^3$ est
	CE 2	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	5×10^3	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est
	RN 1	$4,6 \times 10^5$	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	$5,8 \times 10^6$	$7,8 \times 10^3$ est	$3,3 \times 10^4$
	RN 2	$1,9 \times 10^6$	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	$5,7 \times 10^6$	$4,9 \times 10^3$	3×10^2 est
	Média	$6,1 \times 10^5$ ^c	$<1 \times 10^2$ ^d	$<1 \times 10^2$ ^d	$2,9 \times 10^6$ ^{ac}	$7,2 \times 10^3$ ^b	$8,9 \times 10^3$ ^b

CE: Fazendas do Ceará 1 e 2, RN: Fazendas do Rio Grande do Norte 1 e 2. Letras iguais: Valores médios estatisticamente iguais ($P > 0,05$). Letras diferentes: Valores médios estatisticamente diferentes. ($P < 0,05$).

Tabela 5 - Contagem Padrão em Placas (CPP) das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por g ou mL de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis nas fazendas de carcinicultura analisadas no ponto de coleta "canal de drenagem" no período de estio e chuvoso.

Ponto de coleta	Estio			Chuvoso			
	BHC	BHC+TET	BHC+OTC	BHC	BHC+TET	BHC+OTC	
Água	CE 1	$5,3 \times 10^7$	$4,5 \times 10^2$ est	$2,7 \times 10^2$ est	$5,8 \times 10^6$	$6,9 \times 10^2$ est	2×10^2 est
	RN 1	$2,6 \times 10^7$	2×10^2 est	1×10^3 est	8×10^7	$2,1 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$
	RN 2	$1,2 \times 10^9$	2×10^2 est	$2,5 \times 10^2$ est	$3,4 \times 10^7$	$2,8 \times 10^4$	$1,9 \times 10^5$ est
	Média	$4,9 \times 10^8$ ^a	$2,8 \times 10^2$ ^b	$5,1 \times 10^2$ ^b	$3,9 \times 10^7$ ^a	$1,6 \times 10^4$ ^c	$6,8 \times 10^4$ ^c
Sedimento	CE 1	5×10^4	$1,3 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	$1,9 \times 10^6$	5×10^3 est	3×10^2 est
	RN 1	$1,7 \times 10^8$ est	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	$1,2 \times 10^6$	$<1 \times 10^2$ est	$2,5 \times 10^2$ est
	RN 2	$2,3 \times 10^5$ est	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	$7,2 \times 10^4$	$<1 \times 10^2$ est	3×10^2 est
	Média	$5,6 \times 10^7$ ^a	$1,1 \times 10^2$ ^d	$<1 \times 10^2$ ^d	$1,1 \times 10^6$ ^a	$1,7 \times 10^3$ ^{bc}	$2,8 \times 10^2$ ^{bc}

CE: Fazendas do Ceará 1, RN: Fazendas do Rio Grande do Norte 1 e 2. Fazenda CE 2 não apresentou canal de abastecimento, portanto não foi incluída. Letras iguais: Valores médios estatisticamente iguais ($P > 0,05$). Letras diferentes: Valores médios estatisticamente diferentes. ($P < 0,05$).

Para o ponto de coleta "viveiro", as contagens de BHC totais foram estatisticamente superiores às contagens de BHC+TET e BHC+OTC ($F=8,735$, $p<0,05$) para todos os tratamentos (por período e por local de coleta) (Tabela 4). Entretanto, as contagens de BHC totais, BHC+TET e BHC+OTC da água foram estatisticamente superiores às contagens do sedimento durante o período de estio ($p<0,05$). As contagens de BHC+TET e BHC+OTC entre o período de estio e chuvoso, para as amostras de água, foram estatisticamente iguais ($p>0,05$), contudo para as amostras de sedimento, as contagens de BHC+TET e BHC+OTC foram maiores no período chuvoso que no estio ($p>0,05$) (Tabela 4). Durante o período chuvoso, as contagens de BHC+TET e BHC+OTC das amostras de água e sedimento foram estatisticamente iguais ($p>0,05$).

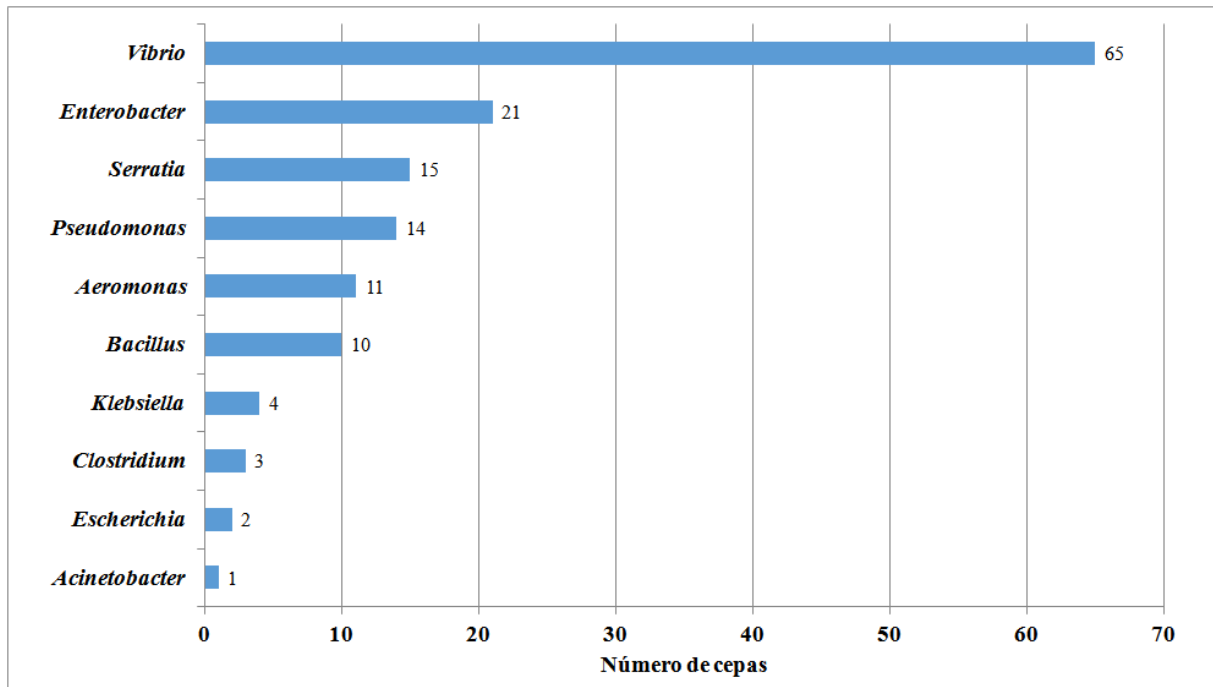
Para o ponto de coleta "canal de drenagem", as contagens de BHC totais foram estatisticamente superiores às contagens de BHC+TET e BHC+OTC ($F=18,564$, $p<0,05$) para todos os tratamentos (por período e por local de coleta) (Tabela 5). As contagens de BHC+TET e BHC+OTC entre o período de estio e chuvoso, para as amostras de água, foram estatisticamente iguais ($p>0,05$). Contudo, para as amostras de sedimento, as contagens de BHC+TET e BHC+OTC durante o período de estio foram estatisticamente inferiores às contagens do período chuvoso ($p<0,05$). As contagens de BHC totais, BHC+TET e BHC+OTC das amostras de água, tanto no período de estio quanto no chuvoso, foram estatisticamente superiores às contagens do sedimento ($p<0,05$). Para as amostras de água e sedimento, as contagens de BHC+TET e BHC+OTC durante o período chuvoso foram estatisticamente superiores às contagens dos mesmos grupos obtidas no período de estio ($p<0,05$) (Tabela 5).

Após a análise de correlação canônica, foi verificado que a variável físico-química salinidade influenciou nas contagens de BHC totais entre os períodos de estio e chuvoso, demonstrando que, independentemente dos pontos de coleta, as precipitações podem ser fator decisivo para a quantificação de bactérias heterotróficas cultiváveis. Para Beardsley *et al.*, (2011), os micro-organismos desempenham um papel importante nos sistemas de aquicultura, porém esses sistemas estão sujeitos à entrada de espécies patogênicas e com perfil de resistência desconhecido. Dessa forma, a quantificação oferece subsídios para avaliação geral da microbiota bacteriana, porém somente a análise da diversidade de gêneros bacterianos, seu perfil antimicrobiano e avaliação da possível patogenicidade são decisivos.

A partir da quantificação da comunidade bacteriana heterotrófica cultivável (BHC total), foi possível se isolar um total de 146 cepas, das quais 72 foram no período de estio e 74 no período chuvoso. Considerando os pontos de coleta, 32 cepas foram isoladas do estuário,

19 do canal de abastecimento (CA), 57 do viveiro e 38 do canal de drenagem (CD). Do total de cepas isoladas, 94 cepas foram oriundas da água e 52 do sedimento. As cepas de BHC foram identificadas bioquimicamente em 10 gêneros diferentes, dos quais *Vibrio* (n=65), *Enterobacter* (n=21) e *Serratia* (n=15) foram os mais recorrentes (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Diversidade de gêneros de bactérias heterotróficas isoladas de carcinoculturas do Ceará e Rio Grande do Norte.



O maior número de isolados do gênero *Vibrio* comprova o fato de que esses micro-organismos são abundantes em ecossistemas marinhos e estuarinos e assumem essencial importância em ambiente de carcinocultura. A recorrência de micro-organismos da família Enterobacteriaceae: *Enterobacter*, *Serratia*, *Klebsiella* e *Escherichia* é preocupante, pois não fazem parte da microbiota natural dos camarões nem do ambiente de cultivo. Dessa forma, possivelmente uma fonte de contaminação externa (ração ofertada, calagem e sanitização ineficiente do viveiro entre os cultivos) seja a explicação para a detecção. Yagoub (2009) relatam a presença de micro-organismos do gênero *Pseudomonas* e *Enterobacter* associados a rações peletizadas e matrizes de camarões cultivados, fato esse que pode confirmar a natureza exógena dessa microbiota no ambiente de carcinocultura.

A diversidade de bactérias heterotróficas foi maior no viveiro ($H'=0,835$) comparado aos demais pontos de coleta. Por período de coleta, a diversidade foi maior no estio ($H'=0,835$) e nas amostras de água ($H'=0,733$) (Tabela 6). O detalhamento da frequência

de isolados, de cada gênero bacteriano, por matriz (período de coleta/amostra/ponto de coleta) é apresentado na tabela 7. Foi possível verificar que *Vibrio* foi o gênero dominante em todos os pontos de coleta. Nas amostras de água e sedimento do estuário, só foram evidenciadas bactérias pertencentes ao gênero *Vibrio*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Aeromonas*.(Tabela7).

Tabela 6 - Índice de diversidade (H') e dominância (C) por período de coleta, amostra e ponto de coleta das bactérias heterotróficas cultiváveis totais, resistentes à tetraciclina e resistentes à oxitetraciclina.

Índices	Período de coleta		Amostra		Ponto de coleta				
	Chuvoso	Estio	Água	Sedimento	Estuário	CA	Viveiro	CD	
BHC	H'	0,630	0,835	0,733	0,709	0,516	0,474	0,835	0,738
	C	0,348	0,169	0,252	0,266	0,341	0,374	0,189	0,208
TET	H'	0,436	0,781	0,688	0,606	0,426	0,452	0,791	0,752
	C	0,490	0,171	0,235	0,300	0,374	0,386	0,199	0,154
OTC	H'	0,371	0,762	0,690	0,486	0,432	0,439	0,740	0,620
	C	0,529	0,177	0,231	0,353	0,345	0,267	0,205	0,194

TET: Bactérias heterotróficas cultiváveis resistentes à tetraciclina

OTC: Bactérias heterotróficas cultiváveis resistentes à oxitetraciclina

Acinetobacter só foi detectada nas amostras de água do viveiro, durante o período chuvoso, enquanto *Escherichia* durante o período de estio. Bactérias do gênero *Acinetobacter* são encontradas no solo, estando intimamente relacionadas com o processo de mineralização de compostos aromáticos (VANBROEKHOVEN *et al.*, 2004). A presença desse micro-organismo na água pode estar relacionada à ressuspensão de matéria orgânica durante o período chuvoso. Já *Clostridium*, que é outro bastonete de solo, só foi encontrado em amostras de sedimento do viveiro. Para Anand *et al.* (2008), a presença de cepas de *Clostridium*, e especificamente *Clostridium perfringens*, em viveiros de camarão pode ser um indicativo da má eficiência dos processos de calagem e desinfecção dos viveiros.

Tabela 7 - Distribuição de bactérias heterotróficas isoladas de carcinoculturas do Ceará e Rio Grande do Norte por local, ponto e período de coleta.

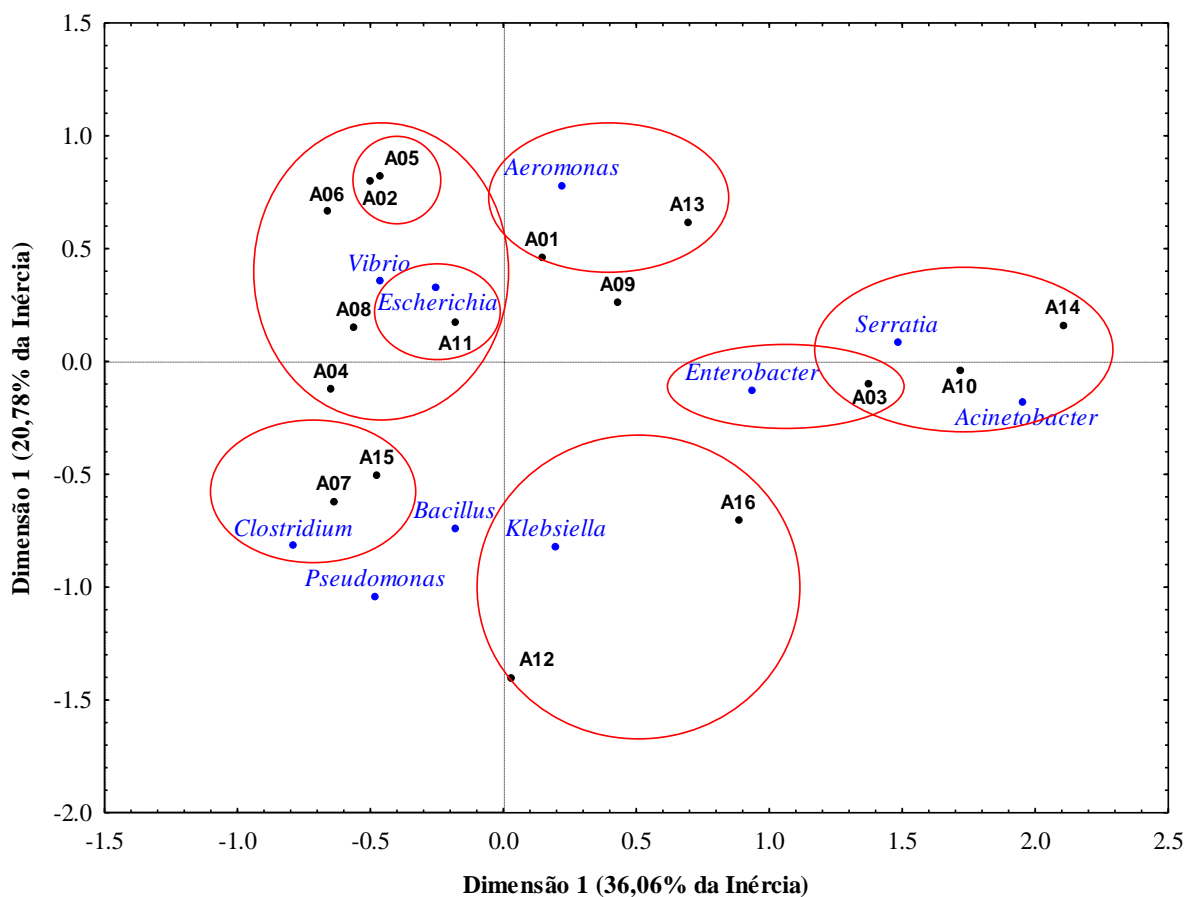
	Estuário (n= 32)		CA (n=19)		Viveiro (n=57)		CD (n=38)	
	Água (n=8)	Sedimento (n=7)	Água (n=6)	Sedimento (n=1)	Água (n=25)	Sedimento (n=12)	Água (n=7)	Sedimento (n=6)
Estio (n=72)	<i>Vibrio</i> (4)	<i>Vibrio</i> (2)	<i>Enterobacter</i> (3)	<i>Serratia</i> (1)	<i>Vibrio</i> (12)	<i>Vibrio</i> (5)	<i>Pseudomonas</i> (4)	<i>Bacillus</i> (2)
	<i>Enterobacter</i> (3)	<i>Aeromonas</i> (2)	<i>Serratia</i> (3)		<i>Pseudomonas</i> (3)	<i>Bacillus</i> (3)	<i>Enterobacter</i> (2)	<i>Serratia</i> (2)
	<i>Serratia</i> (1)	<i>Serratia</i> (2)			<i>Aeromonas</i> (3)	<i>Clostridium</i> (2)	<i>Klebsiella</i> (1)	<i>Enterobacter</i> (1)
		<i>Enterobacter</i> (1)			<i>Enterobacter</i> (2)	<i>Enterobacter</i> (1)		<i>Klebsiella</i> (1)
					<i>Escherichia</i> (2)	<i>Pseudomonas</i> (1)		
				<i>Klebsiella</i> (2)				
				<i>Serratia</i> (1)				
Chuvoso (n=74)	<i>Vibrio</i> (7)	<i>Vibrio</i> (4)	<i>Vibrio</i> (5)	<i>Vibrio</i> (6)	<i>Enterobacter</i> (4)	<i>Vibrio</i> (5)	<i>Vibrio</i> (12)	<i>Vibrio</i> (3)
	<i>Enterobacter</i> (3)	<i>Aeromonas</i> (1)	<i>Aeromonas</i> (1)		<i>Serratia</i> (2)	<i>Pseudomonas</i> (3)	<i>Pseudomonas</i> (3)	<i>Bacillus</i> (1)
	<i>Aeromonas</i> (1)				<i>Acinetobacter</i> (1)	<i>Bacillus</i> (2)	<i>Aeromonas</i> (2)	
	<i>Serratia</i> (1)				<i>Aeromonas</i> (1)	<i>Clostridium</i> (1)	<i>Serratia</i> (2)	
					<i>Bacillus</i> (1)		<i>Bacillus</i> (1)	
						<i>Enterobacter</i> (1)		

CA: Canal de Abastecimento

CD: Canal de Drenagem

A partir do mapa perceptual gerado pela análise de correspondência, foi possível se estabelecer interpretações acerca do perfil de diversidade de BHC pelas matrizes: período de coleta/amostra/ponto de coleta (combinações foram descritas no material e métodos, item 3.4.10.4) (Gráfico 2). As variações dos dados foram explicadas por duas dimensões (dimensão 1 com 36,06% de inércia e dimensão 2 com 20,78% de inércia, totalizando 53,15%) como detalhado no Gráfico 2.

Gráfico 2 - Mapa perceptual da frequência de isolados de bactérias heterotróficas cultiváveis por combinação período de coleta/amostra/ponto de coleta.



Foram determinados cinco (5) grupos com base no perfil de similaridade de diversidade bacteriana: Grupo 1 (A07 e A15), Grupo 2 (A12 e A16), Grupo 3 (A03, A10 e A14), Grupo 4 (A01 e A13) e Grupo 5 (A02, A04, A05, A06, A08 e A11). No gráfico 2 foram evidenciados os grupos correspondentes aos gêneros bacterianos mais associados (círculos vermelhos), dos quais a diversidade bacteriana encontrada na água do viveiro durante o período de chuvoso (intersecção em A03) esteve mais associada à quantificação de *Enterobacter*, *Serratia* e *Acinetobacter*, que pode ser comprovado pelo detalhamento

apresentando na tabela 6.

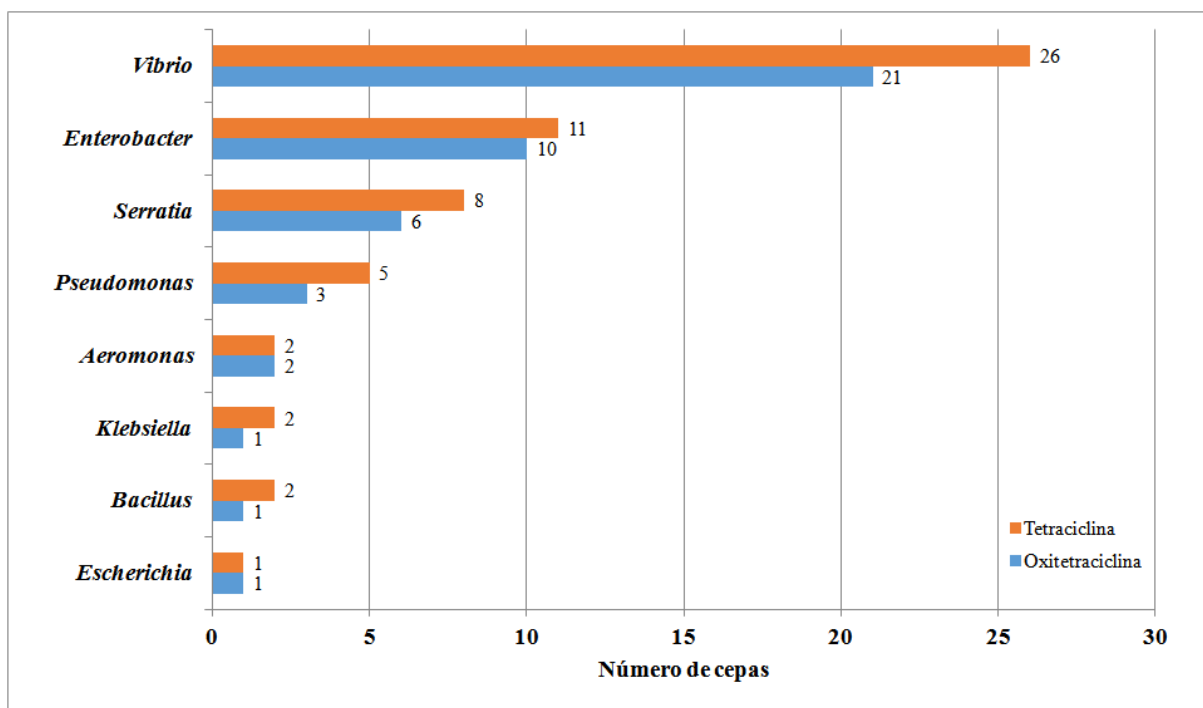
A diversidade de bactérias do sedimento estuarino foi similar à da água do canal de abastecimento durante o período chuvoso, sendo composta pelos gêneros *Vibrio* e *Aeromonas* (Tabela 7). Embora tenha sido encontrada em todos os pontos de coleta, foi verificado que a diversidade *Aeromonas* esteve mais associada ao estuário (A01 e A13) (Gráfico 2) e que os períodos de coleta não influenciaram na sua detecção. As cepas pertencentes a esse gênero não são halofílicas e, no presente estudo, só foram isoladas em águas estuarinas com salinidade máxima de 5, principalmente durante o período chuvoso. Resultado semelhante foi relatado por Silva *et al.* (2014) que, ao analisarem a distribuição de *Aeromonas* ao longo do rio Cocó (município de Fortaleza), verificaram que sua quantificação é tão maior quanto menor forem os valores de salinidade. Isso explica *Aeromonas* não ter sido detectada nas águas estuarinas no período de estio, entretanto, no sedimento, o isolamento de *Aeromonas* parece não ser influenciado pelas variações de salinidade da água. Além disso, o fato de *Aeromonas* ser considerada halotolerantes (em salinidade até 6) justifique o fato de algumas cepas terem sido encontradas nos pontos de coleta com salinidade maior (PIANETTI *et al.*, 2008).

Com relação às enterobactérias, a diversidade de *Escherichia* não foi correlacionada à diversidade de *Enterobacter* e *Serratia* (Gráfico 2). Cepas de *Escherichia* só foram encontradas em amostras de água do viveiro no estio (A11) (Tabela 6). Mesmo não fazendo parte da microbiota natural das águas estuarinas, cepas de *Escherichia* já foram isoladas de ambiente de carcinicultura por Vieira *et al.* (2010), evidenciando que a detecção de bactérias desse gênero é recorrente em cultivo de camarão. Entretanto a detecção de *Serratia* em ambiente de carcinicultura é relativamente nova e merece ser melhor investigada em trabalhos posteriores. Algumas cepas de *Serratia* têm sido associadas como produtoras de quitinase e, considerando que todo o exoesqueleto do camarão é formado de quitina, essas bactérias podem ser facilitadoras de patogenias de origem bacteriana e viral nesses organismos (ZAREI *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2012).

Por *Vibrio* ter sido o gênero bacteriano mais abundante, no mapa perceptual ele foi associado a diferentes matrizes, o que sugere que essa bactéria, quando comparada ao demais gêneros, não teve sua distribuição claramente influenciada pelos pontos de coleta. Costa *et al.* (2010) salientam que a distribuição de víbrios em ecossistemas estuarinos e, conseqüentemente, em ambiente de carcinicultura é consideravelmente influenciada pela disponibilidade de nutrientes, o que talvez justifique a grande quantidade de cepas de *Vibrio* encontradas nas fazendas de carcinicultura objeto de estudo da presente tese.

Foram isoladas 57 cepas com resistência à tetraciclina e 45 à oxitetraciclina. Considerando-se a diversidade de BHC com resistência TET e OTC, *Vibrio* foi novamente o gênero mais recorrente, apresentando 26 cepas com resistência à tetraciclina e 21 com resistência à oxitetraciclina (Gráfico 3). Em comparação à diversidade de BHC totais, dois (2) gêneros bacterianos não foram relatados dentre os isolados com resistência: *Acinetobacter* e *Clostridium*. Embora todos os gêneros bacterianos tenham sido compartilhados entre os dois grupos (BHC+TET e BHC+OTC), a quantificação de bactérias resistentes foi considerada alta (em relação às BHC totais), principalmente para aqueles micro-organismos com reconhecida patogenicidade ao homem e organismos cultivados: *Serratia*, *Klebsiella*, *Aeromonas* e *Vibrio*.

Gráfico 3 - Diversidade de bactérias heterotróficas resistentes à tetraciclina e oxitetraciclina isoladas de carcinoculturas do Ceará e Rio Grande do Norte.



Yano *et al.* (2011), em estudo feito em carcinoculturas da Tailândia encontraram alta recorrência de cepas de *Vibrio* e *Aeromonas* com resistência à oxitetraciclina, o que demonstra que a resistência de cepas desses gêneros não é apenas um caso isolado em fazendas de camarão do nordeste do Brasil. Outrossim, *Vibrio* foi o único micro-organismo resistente a TET encontrado nas amostras de sedimento do estuário, canal de abastecimento e canal de drenagem durante o período chuvoso (Tabela 8). Para BHC+OTC, *Vibrio* foi encontrado em todos os pontos de coleta do sedimento também durante o período chuvoso (Tabela 9).

Tabela 8 - Distribuição de bactérias heterotróficas com resistência à tetraciclina isoladas de carciniculturas do Ceará e Rio Grande do Norte por local, ponto e período de coleta.

	Estuário (n=14)		CA (n=8)		Viveiro (n=22)		CD (n=13)	
	Água (n=4)	Sedimento (n=4)	Água (n=3)	Sedimento (n=1)	Água (n=10)	Sedimento (n=5)	Água (n=3)	Sedimento (n=4)
Estio (n=34)	<i>Vibrio</i> (2)	<i>Serratia</i> (2)	<i>Enterobacter</i> (2)	<i>Serratia</i> (1)	<i>Vibrio</i> (4)	<i>Vibrio</i> (3)	<i>Pseudomonas</i> (2)	<i>Bacillus</i> (1)
	<i>Enterobacter</i> (1)	<i>Vibrio</i> (1)	<i>Serratia</i> (1)		<i>Pseudomonas</i> (2)	<i>Bacillus</i> (1)	<i>Enterobacter</i> (1)	<i>Enterobacter</i> (1)
	<i>Serratia</i> (1)	<i>Enterobacter</i> (1)			<i>Aeromonas</i> (1)	<i>Enterobacter</i> (1)		<i>Serratia</i> (1)
					<i>Enterobacter</i> (1)			<i>Klebsiella</i> (1)
					<i>Escherichia</i> (1)			
				<i>Klebsiella</i> (1)				
Chuvoso (n=22)	<i>Vibrio</i> (3)	<i>Vibrio</i> (2)	<i>Vibrio</i> (2)	<i>Vibrio</i> (2)	<i>Enterobacter</i> (2)	<i>Vibrio</i> (2)	<i>Vibrio</i> (3)	<i>Vibrio</i> (2)
	<i>Enterobacter</i> (1)				<i>Serratia</i> (2)	<i>Pseudomonas</i> (1)	<i>Aeromonas</i> (1)	

CA: Canal de Abastecimento

CD: Canal de Drenagem

Tabela 9 - Distribuição de bactérias heterotróficas com resistência à oxitetraciclina isoladas de carcinoculturas do Ceará e Rio Grande do Norte por local, ponto e período de coleta.

	Estuário (n=11)		CA (n=6)		Viveiro (n=19)		CD (n=9)	
	Água (n=3)	Sedimento (n=3)	Água (n=2)	Sedimento (n=1)	Água (n=10)	Sedimento (n=4)	Água (n=2)	Sedimento (n=2)
Estio (n=27)	<i>Vibrio</i> (2)	<i>Serratia</i> (2)	<i>Enterobacter</i> (1)	<i>Serratia</i> (1)	<i>Vibrio</i> (4)	<i>Vibrio</i> (2)	<i>Enterobacter</i> (1)	<i>Enterobacter</i> (1)
	<i>Enterobacter</i> (1)	<i>Enterobacter</i> (1)	<i>Serratia</i> (1)		<i>Pseudomonas</i> (2)	<i>Bacillus</i> (1)	<i>Pseudomonas</i> (1)	<i>Serratia</i> (1)
					<i>Aeromonas</i> (1)	<i>Enterobacter</i> (1)		
					<i>Enterobacter</i> (1)			
					<i>Escherichia</i> (1)			
				<i>Klebsiella</i> (1)				
Chuvoso (n=18)	<i>Vibrio</i> (2)	<i>Vibrio</i> (2)	<i>Vibrio</i> (1)	<i>Vibrio</i> (2)	<i>Enterobacter</i> (2)	<i>Vibrio</i> (2)	<i>Vibrio</i> (2)	<i>Vibrio</i> (2)
	<i>Enterobacter</i> (1)				<i>Serratia</i> (1)		<i>Aeromonas</i> (1)	

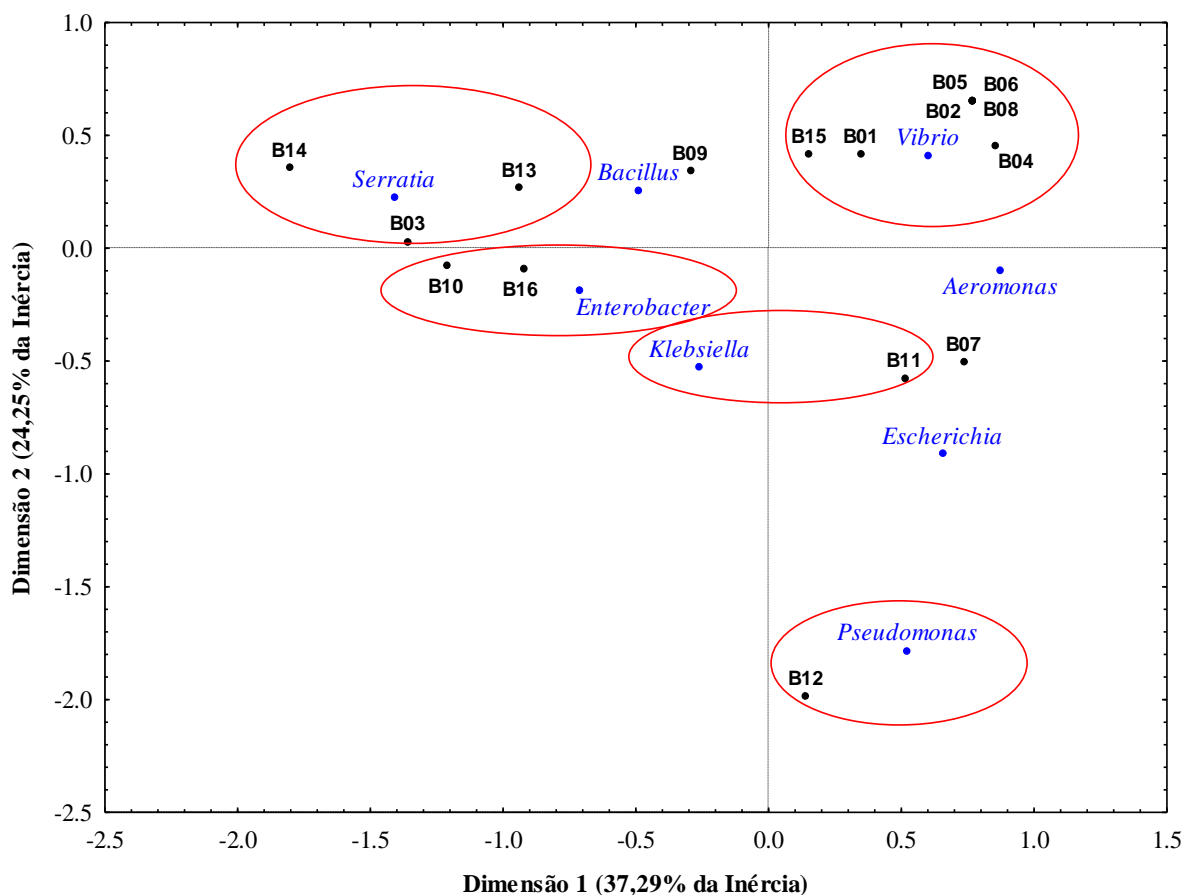
CA: Canal de Abastecimento

CD: Canal de Drenagem

A diversidade de BHC+TET e BHC+OTC foi maior no ponto de coleta "viveiro". Assim como ocorreu para demais BHC totais, foi verificado que a diversidade de bactérias resistentes foi maior durante o período de estio e para as amostras de água (Tabela 6). A maior diversidade de bactérias resistentes a TET e OTC no viveiro, possivelmente, demonstra um problema crônico no uso desses antimicrobianos em cultivo de camarão. Segundo Mackie *et al.* (2006) a presença de bactérias resistentes a antimicrobianos da classe das tetraciclina no ambiente marinho ou estuarino e, principalmente, no cultivo de organismos comprova o uso recente desses antimicrobianos.

Do mapa perceptual, gerado a partir das frequências de BHC+TET nas diferentes matrizes, foi possível se estabelecer quatro (4) grupos com base nos perfis de similaridade (duas dimensões, totalizando 61,54% de inércia): Grupo 1 (B01, B02, B04, B05, B06 e B15), Grupo 2 (B03, B13 e B14), Grupo 3 (B10 e B16), Grupo 4 (B07 e B11) (Gráfico 4). No gráfico 4 estão circuladas as matrizes mais correlacionadas e o respectivo grupo bacteriano que mais promoveu essa associação.

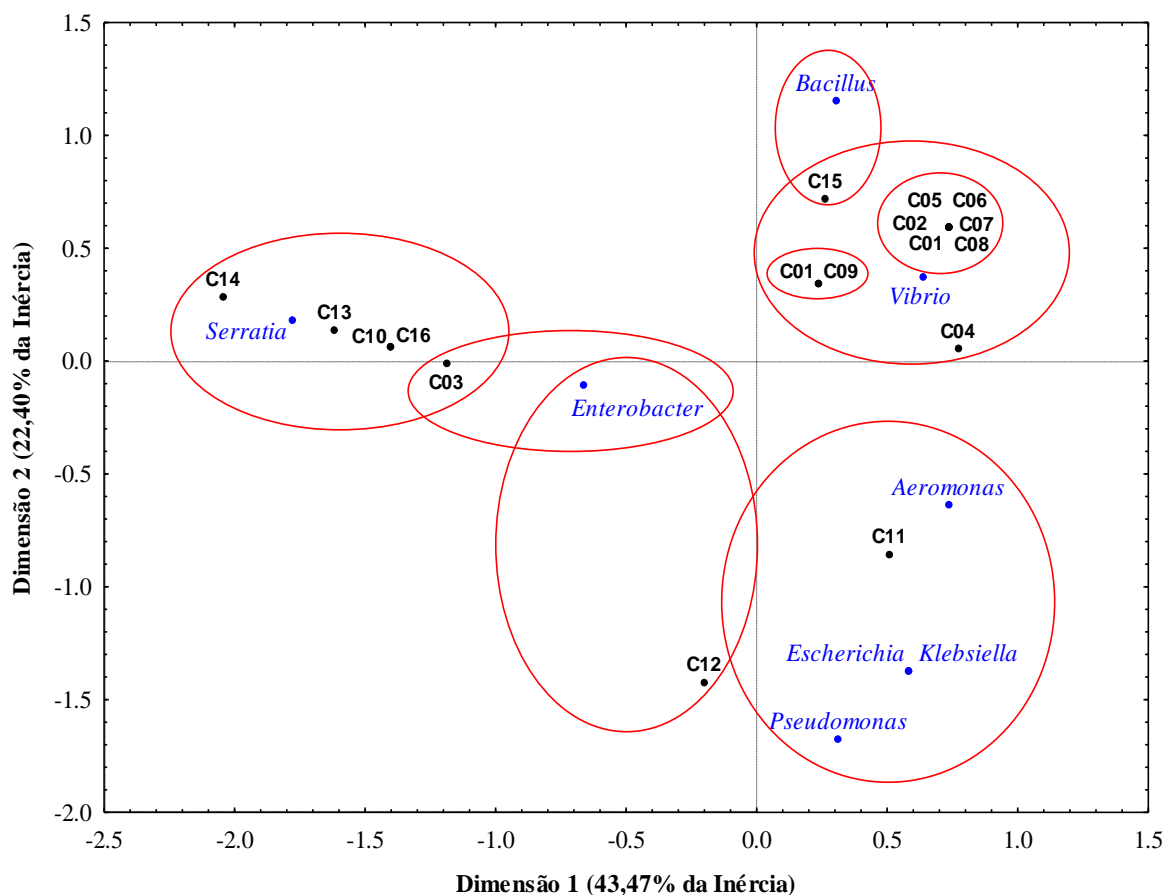
Gráfico 4 - Mapa perceptual da frequência de isolados de bactérias heterotróficas cultiváveis resistentes à tetraciclina por combinação período de coleta/amostra/ponto de coleta.



Foi possível verificar que a interação existente entre a diversidade bacteriana da água do viveiro no período chuvoso (B03) e a diversidade do sedimento do canal de drenagem no período de estio (B16) foi mais associada à frequência de *Enterobacter* (Gráfico 4). A diversidade de bactérias resistentes nas amostras de água do viveiro no período de estio (B11) esteve mais associada à frequência de *Klebsiella*, enquanto do canal de drenagem à *Pseudomonas*. As matrizes associadas às frequências de *Vibrio* e *Serratia* foram distintas, sendo apresentadas nos extremos da dimensão 1 (Gráfico 4).

Do mapa perceptual gerado a partir das frequências de BHC+OTC nas diferentes matrizes, foram estabelecidos dois (2) grupos com base nos perfis de similaridade (duas dimensões, totalizando 65,51% de inércia): Grupo 1 (C01, C02, C04, C05, C06, C07, C08 e C09) e Grupo 2 (C03, C10, C13, C14 e C16) (Gráfico 5). Ainda no gráfico 5 foram circuladas as matrizes mais correlacionadas e o respectivo grupo bacteriano que mais concorreu para essa associação.

Gráfico 5 - Mapa perceptual da frequência de isolados de bactérias heterotróficas cultiváveis resistentes à oxitetraciclina por combinação período de coleta/amostra/ponto de coleta.



A diversidade de gêneros de BHC+OTC encontrados no viveiro (amostra de sedimento) durante o período chuvoso (C15) foi fortemente influenciada pelos gêneros *Bacillus* e *Vibrio*. Já para as amostras de sedimento, no período de estio, foram *Serratia* e *Enterobacter* (Gráfico 5). A diversidade bacteriana na água do estuário foi equivalente entre os períodos de estio e chuvoso (C01 e C09) com microbiota composta de *Vibrio* e *Enterobacter*. *Aeromonas*, *Escherichia*, *Klebsiella* e *Pseudomonas* foram os gêneros bacterianos que mais influenciaram, na diversidade de BHC+OTC, as amostras de água do viveiro durante o período de estio (Gráfico 5).

Em estudo realizado por Tendencia e Peña (2002), foram detectadas cepas de *Vibrio*, *Pseudomonas* e *Aeromonas* resistentes à oxitetraciclina em ambiente de cultivo de camarão nas Filipinas, à imitação do relatado na presente tese. Já Boinapally e Jiang (2007) afirmam que a alta resistência às tetraciclina em ambientes tropicais é devido à alta solubilidade desses antimicrobianos nas águas costeiras, ao contrário do que ocorre em ecossistemas temperados, nos quais as bactérias resistentes são mais facilmente isoladas no sedimento e nos próprios organismos cultivados.

4.3 Quantificação e diversidade de *Vibrio*

De forma geral, as contagens de *Vibrio* foram equivalentes nos quatro (4) pontos de coleta (Tabelas 10 a 13). As contagens de *Vibrio* sacarose positivo e negativo foram consideradas estatisticamente iguais para todos os pontos analisados ($P > 0,05$). Entretanto, considerando-se as amostras, todas as contagens de *Vibrio* total da água foram estatisticamente superiores às do sedimento ($P < 0,05$). Em pelo menos uma amostra de sedimento de cada fazenda foram verificadas contagens de *Vibrio*, no período de estio abaixo de $100 \text{ UFC.mL}^{-1}/\text{g}^{-1}$. Em contrapartida, no período chuvoso, as contagens de *Vibrio* total, sacarose positivos e negativos foram superiores para as amostras de sedimento do viveiro ($p < 0,05$) (Tabela 12). Para as amostras de água, assim como observado no comportamento das BHC, BHC+TET e BHC+OTC, as contagens de *Vibrio* total, sacarose positivos e negativos foram superiores no período chuvoso nos pontos de coleta: viveiro e canal de drenagem (Tabelas 12 e 13).

Tabela 10 - Contagem Padrão em Placas (CPP) das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *Vibrio* nas fazendas de carcinicultura analisadas no ponto de coleta "estuário" no período de estio e chuvoso.

Ponto de coleta	Estio			Chuvoso			
	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio sac+</i>	<i>Vibrio sac-</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio sac+</i>	<i>Vibrio sac-</i>	
Água	CE 1	1,1×10 ³ est	<1×10 ² est	<1×10 ² est	1,4×10 ³ est	4×10 ² est	3×10 ² est
	CE 2	3,8×10 ³	2,5×10 ² est	3×10 ² est	<1×10 ² est	<1×10 ² est	<1×10 ² est
	RN 1	1,1×10 ⁶	4,6×10 ³ est	2×10 ³	6,1×10 ⁷ est	5×10 ⁴ est	6,7×10 ⁴ est
	RN 2	3,5×10 ⁶ est	<1×10 ² est	2×10 ³ est	1,1×10 ⁷	1,3×10 ⁵ est	2×10 ⁵ est
	Média	3,6×10 ^{6a}	1,1×10 ^{3b}	5,6×10 ^{3b}	1,8×10 ^{7a}	3,4×10 ^{4b}	6,7×10 ^{4b}
Sedimento	CE 1	<1×10 ² est	<1×10 ² est	<1×10 ² est	2×10 ² est	<1×10 ² est	<1×10 ² est
	CE 2	<1×10 ² est	<1×10 ² est	<1×10 ² est	<1×10 ² est	<1×10 ² est	<1×10 ² est
	RN 1	1,4×10 ³ est	<1×10 ² est	<1×10 ² est	9×10 ² est	<1×10 ² est	<1×10 ² est
	RN 2	<1×10 ² est	<1×10 ² est	<1×10 ² est	1,5×10 ² est	<1×10 ² est	<1×10 ² est
	Média	4,2×10 ^{2c}	<1×10 ^{2estb}	<1×10 ^{2estb}	3,4×10 ^{2c}	<1×10 ^{2estb}	<1×10 ^{2estb}

CE: Fazendas do Ceará 1 e 2, RN: Fazendas do Rio Grande do Norte 1 e 2. Letras iguais: Valores médios estatisticamente iguais (P>0,05). Letras diferentes: Valores médios estatisticamente diferentes. (P<0,05).

Tabela 11 - Contagem Padrão em Placas (CPP) das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *Vibrio* nas fazendas de carcinicultura analisadas no ponto de coleta "canal de abastecimento" no período de estio e chuvoso.

Ponto de coleta	Estio			Chuvoso			
	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio sac+</i>	<i>Vibrio sac-</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio sac+</i>	<i>Vibrio sac-</i>	
Água	CE 1	1,6×10 ⁵	2×10 ⁴ est	3,5×10 ³ est	2×10 ² est	<1×10 ² est	<1×10 ² est
	RN 1	2,6×10 ⁶	1,5×10 ⁴ est	3,4×10 ⁴ est	1×10 ⁵ est	2,1×10 ⁴ est	1,7×10 ⁴ est
	RN 2	5,8×10 ⁵	5×10 ⁴ est	2,1×10 ³ est	2×10 ⁶	3×10 ⁴ est	4×10 ³
	Média	1,1×10 ^{6a}	2,8×10 ^{4b}	2,4×10 ^{4b}	7×10 ^{6a}	1,7×10 ^{4b}	1,1×10 ^{4b}
Sedimento	CE 1	<1×10 ² est	<1×10 ² est	<1×10 ² est	<1×10 ² est	<1×10 ² est	<1×10 ² est
	RN 1	7,6×10 ³	<1×10 ² est	<1×10 ² est	<1×10 ² est	<1×10 ² est	<1×10 ² est
	RN 2	2,2×10 ³ est	2×10 ² est	2,1×10 ² est	9,5×10 ² est	<1×10 ² est	<1×10 ² est
	Média	3,3×10 ^{3c}	1,3×10 ^{2d}	1,4×10 ^{2d}	3,8×10 ^{2c}	<1×10 ^{2estd}	<1×10 ^{2estd}

CE: Fazendas do Ceará 1 e 2, RN: Fazendas do Rio Grande do Norte 1 e 2. Letras iguais: Valores médios estatisticamente iguais (P>0,05). Letras diferentes: Valores médios estatisticamente diferentes. (P<0,05).

Tabela 12 - Contagem Padrão em Placas (CPP) das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *Vibrio* nas fazendas de carcinicultura analisadas no ponto de coleta "viveiro" no período de estio e chuvoso.

Ponto de coleta	Estio			Chuvoso			
	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio sac+</i>	<i>Vibrio sac-</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio sac+</i>	<i>Vibrio sac-</i>	
Água	CE 1	$6,1 \times 10^3$	2×10^2	2×10^2 est	$3,8 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est
	CE 2	$5,9 \times 10^4$	$4,1 \times 10^3$ est	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est
	RN 1	$1,9 \times 10^6$	$2,1 \times 10^4$	$2,6 \times 10^3$	$3,4 \times 10^7$	$1,9 \times 10^6$	$5,6 \times 10^5$
	RN 2	$1,2 \times 10^6$	$6,5 \times 10^5$ est	$9,1 \times 10^4$ est	$1,6 \times 10^7$	$1,8 \times 10^6$	$<1 \times 10^2$ est
	Média	$5,1 \times 10^6$ ^a	$1,7 \times 10^5$ ^b	$2,4 \times 10^4$ ^b	$1,2 \times 10^7$ ^b	$9,2 \times 10^5$ ^c	$1,4 \times 10^5$ ^c
Sedimento	CE 1	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	5×10^2 est	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est
	CE 2	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est
	RN 1	$5,5 \times 10^3$ est	$2,2 \times 10^2$ est	$1,6 \times 10^2$ est	$2,9 \times 10^4$ est	3×10^3 est	$2,1 \times 10^2$ est
	RN 2	5×10^2 est	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	$6,5 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est
	Média	$1,5 \times 10^3$ ^d	$1,3 \times 10^2$ ^d	$1,1 \times 10^2$ ^d	$7,5 \times 10^3$ ^d	$8,2 \times 10^2$ ^d	$1,3 \times 10^2$ ^d

CE: Fazendas do Ceará 1 e 2, RN: Fazendas do Rio Grande do Norte 1 e 2. Letras iguais: Valores médios estatisticamente iguais ($P > 0,05$). Letras diferentes: Valores médios estatisticamente diferentes. ($P < 0,05$).

Tabela 13 - Contagem Padrão em Placas (CPP) das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *Vibrio* nas fazendas de carcinicultura analisadas no ponto de coleta "canal de drenagem" no período de estio e chuvoso.

Ponto de coleta	Estio			Chuvoso			
	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio sac+</i>	<i>Vibrio sac-</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio sac+</i>	<i>Vibrio sac-</i>	
Água	CE 1	$1,5 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	
	RN 1	$2,8 \times 10^5$	$1,5 \times 10^3$ est	2×10^4 est	$2,8 \times 10^7$ est	$7,1 \times 10^4$ est	2×10^5 est
	RN 2	$4,1 \times 10^5$	$6,1 \times 10^3$ est	$<1 \times 10^2$ est	$8,2 \times 10^5$	3×10^4 est	$1,9 \times 10^4$ est
	Média	$2,3 \times 10^5$ ^a	$2,6 \times 10^3$ ^b	$6,7 \times 10^3$ ^b	$9,6 \times 10^6$ ^c	$3,3 \times 10^4$ ^d	$1,3 \times 10^5$ ^d
Sedimento	CE 1	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	
	RN 1	$9,2 \times 10^3$	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	
	RN 2	$2,2 \times 10^2$	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est	$1,7 \times 10^3$ est	$<1 \times 10^2$ est	$<1 \times 10^2$ est
	Média	$3,1 \times 10^2$ ^e	$<1 \times 10^2$ est ^f	$<1 \times 10^2$ est ^f	$6,3 \times 10^2$ ^e	$<1 \times 10^2$ est ^f	$<1 \times 10^2$ est ^f

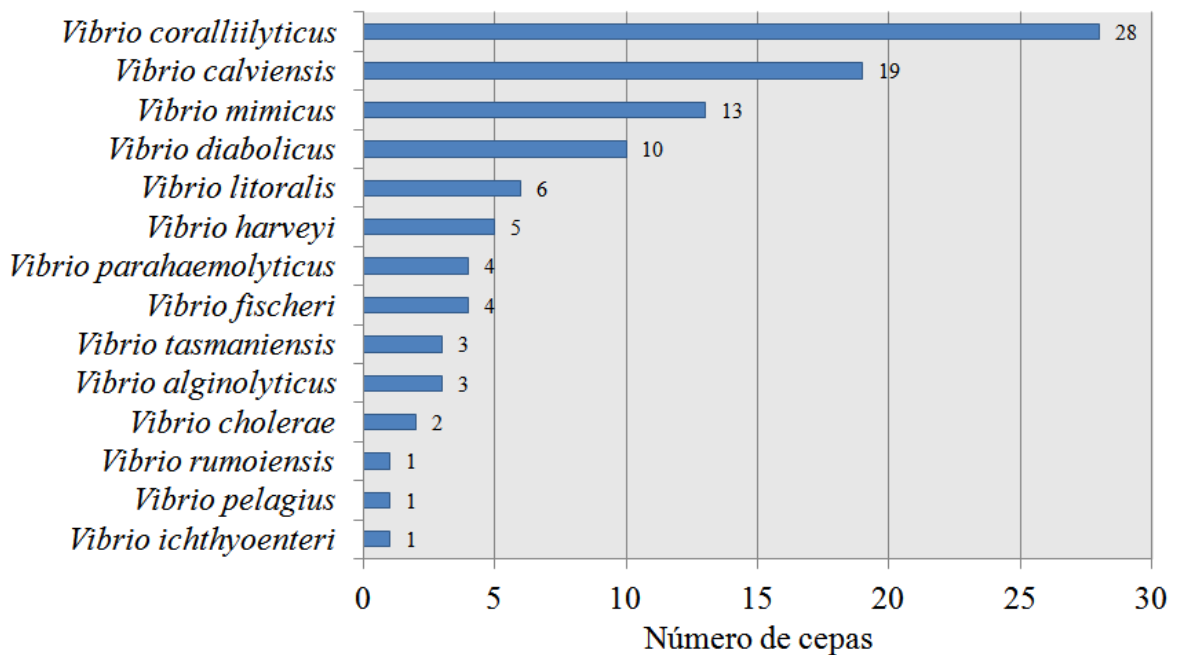
CE: Fazendas do Ceará 1 e 2, RN: Fazendas do Rio Grande do Norte 1 e 2. Letras iguais: Valores médios estatisticamente iguais ($P > 0,05$). Letras diferentes: Valores médios estatisticamente diferentes. ($P < 0,05$).

Não foi verificada correlação entre as variáveis físico-químicas temperatura e pH e as contagens de *Vibrio* sacarose positivo e negativo ($P > 0,05$), entretanto a salinidade influenciou nas contagens de *Vibrio*, o que já era esperado pois são micro-organismos quase

em sua totalidade halofílicos. Esse fato pode ser comprovado pelas maiores quantificações no período chuvoso (salinidade menor) que no estio (salinidade maior) ($P < 0,05$). Pinto *et al.* (2011) salientam que, embora *Vibrio* seja normalmente quantificado em sacarose positivo e sacarose negativo, ambos os grupos apresentam patógenos ao camarão marinho cultivado como *Vibrio parahaemolyticus* (sac -) e *V. fischeri* (sac +). Já Marcel *et al.* (2012) salientam que, além da salinidade influenciar na quantificação de *Vibrio*, possivelmente, a diversidade de bactérias desse gênero também é afetada por essa variável.

Com relação à diversidade de *Vibrio*, foram isoladas 100 cepas de 14 espécies diferentes, com destaque para *Vibrio coralliilyticus* (n=28), *V. calviensis* (n=19), *V. mimicus* (n=13) e *V. diabolicus* (n=10) (Gráfico 6). Mesmo *V. coralliilyticus* sendo a espécie com maior quantidade de cepas isoladas, *V. calviensis* foi dominante nos pontos de coleta estuário, canal de abastecimento e canal de drenagem. Este fato não é novidade, pois *V. calviensis* tem sido relatado como uma espécie abundante em águas marinhas e/ou estuarinas com estirpes já, reconhecidamente, isoladas de água (VIEIRA *et al.*, 2010) e sedimento (LIMA, 2006) de viveiros de camarão.

Gráfico 6 - Diversidade de *Vibrio* spp. isolados em todos os pontos de coleta, na água e sedimento, em fazendas de carcinicultura do nordeste brasileiro.



Dentre os pontos de coleta, foram isoladas 30 cepas de *Vibrio* do estuário, 27 do canal de abastecimento, 23 do viveiro e 20 do canal de drenagem (Tabela 14). A diversidade

de espécies de *Vibrio* foi maior no canal de drenagem ($H'=0,914$), seguido do canal de abastecimento (0,893), estuário (0,831) e viveiro (0,707) (Tabela 13). Por conseguinte, o índice de dominância foi superior para o viveiro ($C=0,249$), explicado pela maior recorrência de cepas de *V.coralliilyticus* (Tabela 6). Embora nas amostras de água e sedimento do estuário tenha sido evidenciada a maior quantificação de *Vibrio*, a diversidade foi baixa quando comparada ao canal de abastecimento e ao canal de drenagem. Ainda a respeito da diversidade de *Vibrio* do estuário, os maiores números de isolados foram de *V.calviensis* ($n=7$), *V.coralliilyticus* ($n=6$) e *V.diaboliicus* ($n=5$).

Tabela 14 - Diversidade de espécies de *Vibrio* isoladas de carcinoculturas do Ceará e Rio Grande do Norte por ponto de coleta.

Espécie	Estuário	CA	Viveiro	CD	Total
<i>Vibrio alginolyticus</i>	2	-	1	-	3
<i>Vibrio calviensis</i>	7	6	2	4	19
<i>Vibrio cholerae</i>	-	1	1	-	2
<i>Vibrio coralliilyticus</i>	6	8	11	3	28
<i>Vibrio diaboliicus</i>	5	2	1	2	10
<i>Vibrio fischeri</i>	-	-	2	2	4
<i>Vibrio harveyi</i>	2	1	-	2	5
<i>Vibrio ichthyoenteri</i>	1	-	-	-	1
<i>Vibrio littoralis</i>	2	3	-	1	6
<i>Vibrio mimicus</i>	5	1	4	3	13
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	1	1	2	4
<i>Vibrio pelagius</i>	-	1	-	-	1
<i>Vibrio rumoiensis</i>	-	1	-	-	1
<i>Vibrio tasmaniensis</i>	-	2	-	1	3
Índice de diversidade (H')	0,831	0,893	0,707	0,914	
Índice de dominância (C)	0,136	0,137	0,249	0,084	
Total	30	27	23	19	100

CA: Canal de abastecimento; CD: Canal de Drenagem

Outras espécies como *V. harveyi* e *V. parahaemolyticus* merecem especial atenção devido ao seu histórico de patogenicidade e surtos alimentares relacionados ao camarão marinho cultivado. *V. harveyi* foi encontrado nos pontos de coleta estuário, canal de abastecimento e canal de drenagem, enquanto *V. parahaemolyticus* foi encontrado no canal de abastecimento, drenagem e estuário. Kannapiran *et al.* (2009) ressaltam que *V. harveyi* é uma espécie constantemente encontrada em ambiente de carcinocultura. Ademais, os autores consideram que essa espécie é capaz de expressar luminescência, que é um importante fenótipo de patogenicidade. Já Soto-Rodriguez *et al.* (2012) relacionam essa espécie como oportunista em camarões acometidos pela síndrome de Taura.

Considerando-se as amostras, foram isoladas e identificadas 77 cepas de *Vibrio* das amostras de água, enquanto do sedimento foram 23 (Tabela 14). Outrossim, a diversidade de *Vibrio* nas amostras de sedimento ($H'=0,995$) foi superior à da água ($H'=0,880$). No sedimento, não houve necessariamente uma espécie dominante ($C=0,071$), entretanto, nas amostras de água, *V.coralliilyticus* foi a mais recorrente (Tabela 14). Entre os períodos de coleta, foram isolados 56 cepas de *Vibrio* no período de estio e 44 no período chuvoso.

A diversidade de *Vibrio* no período chuvoso ($H'=1,040$) foi maior que no período de estio (0,711), entretanto no estio o número de isolados foi superior ($n=56$) (Tabela 15). Durante o período chuvoso a espécie dominante foi *V.calviensis* ($n=11$), enquanto no estio *V. coralliilyticus* ($n=25$). A equivalência de espécies de *Vibrio* durante os períodos de coleta corrobora com a hipótese de que no Nordeste brasileiro não há uma diferenciação entre o período considerado de estio e do considerado chuvoso como ocorre em outras regiões (CAVALCANTI, 2015). Por outro lado, nesse estudo foi possível verificar que *Vibrio* é mais facilmente isolado da água que do sedimento (Tabela 2).

Tabela 15 - Diversidade de *Vibrio* isolados de carciniculturas do Ceará e Rio Grande do Norte por período e amostra.

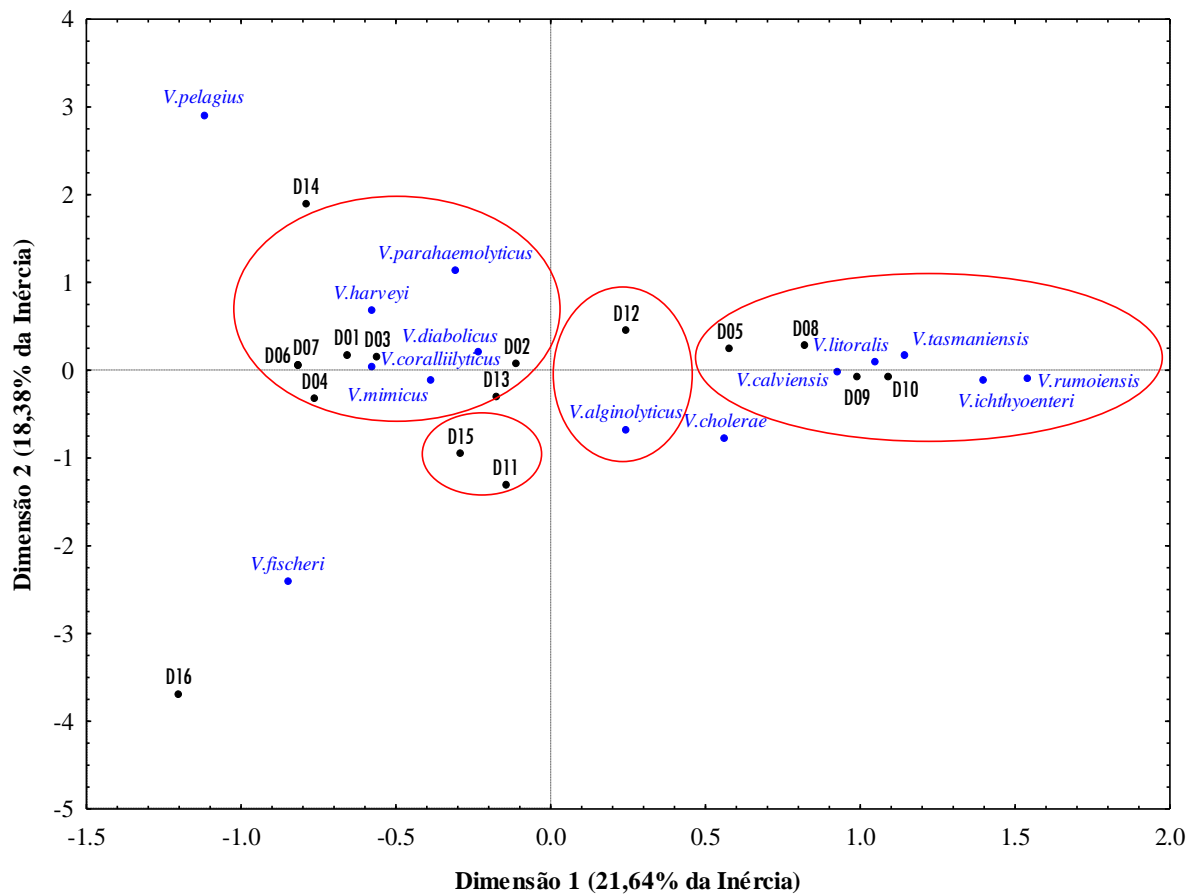
Espécie	Período		Amostra		Total
	Estio	Chuvoso	Água	Sedimento	
<i>Vibrio alginolyticus</i>	-	3	1	2	3
<i>Vibrio calviensis</i>	8	11	17	2	19
<i>Vibrio cholerae</i>	-	2	1	1	2
<i>Vibrio coralliilyticus</i>	25	3	24	4	28
<i>Vibrio diabolicus</i>	5	5	6	4	10
<i>Vibrio fischeri</i>	1	3	2	2	4
<i>Vibrio harveyi</i>	4	1	3	2	5
<i>Vibrio ichthyoenteri</i>	-	1	1	-	1
<i>Vibrio littoralis</i>	3	3	4	2	6
<i>Vibrio mimicus</i>	9	4	11	2	13
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1	3	3	1	4
<i>Vibrio pelagius</i>	-	1	-	1	1
<i>Vibrio rumoiensis</i>	-	1	1	-	1
<i>Vibrio tasmaniensis</i>	-	3	3	-	3
Índice de diversidade (H')	0,711	1,040	0,880	0,995	
Índice de dominância (C)	0,249	0,095	0,170	0,071	
Total	56	44	77	23	100

V. rumoiensis tem sido considerada como uma bactéria endógena do Atlântico norte, entretanto com relatos de isolamento em ambientes tropicais, à semelhança da presente tese (YUMOTO *et al.*, 1999, COSTA *et al.*, 2013). *V. ichthyoenteri* é considerado um

patógeno do halibutes, *Paralichthys olivaceus*, também comum de ambientes temperados. Já *V. pelagius* é uma bactéria com inúmeros relatos em ambiente de carcinicultura, inclusive com possível associação com fatores de virulência (LABREUCHE *et al.*, 2012; SONIA; LIPTON, 2011; ROCHA, 2011).

A partir do mapa perceptual (duas dimensões, 40,02% de inércia), foi verificado que a diversidade de *Vibrio*, durante o período de estio, nas amostras de água e sedimento foram similares para o viveiro (D11 e D15) (Gráfico 7). A frequência de *V. coralliilitucus* e *V. mimicus* foi similar nas diferentes matrizes e não correlacionada à frequência de *V. calviensis* e *V. litoralis* (Dimensão 1). A distribuição de *V. pelagius* (extremo da dimensão 2), *V. ichthyenteri* e *V. rumoiensis* (extremos da dimensão 1) já era esperada, pois apenas uma cepa de cada uma dessas espécies foi detectada (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Mapa perceptual da frequência de espécies de *Vibrio* por combinação período de coleta/amostra/ponto de coleta.



Foi verificado que a distribuição de *V. fischeri* e *V. pelagius* foi dissimilar entre os períodos de coleta e pontos analisados (Gráfico 7). A diversidade de *Vibrio* durante o período de estio, para as amostras de água, foi semelhante entre o estuário e canal de drenagem,

estando intimamente relacionada à detecção de *V.litoralis* e *V.tasmaniensis*. Em contrapartida, a distribuição de *V.corallilyticus*, *V.diabolicus*, *V.harveyi*, *V.parahaemolyticus* e *V.mimicus* foi similar, porém não sofreu alteração por período ou ponto de coleta. Esse fato sugere que, após o período chuvoso, a microbiota destas espécies de *Vibrio* tende a ser uniformemente distribuída tanto em águas estuarinas quanto em águas de cultivo.

A diversidade de *Vibrio* no sedimento do viveiro, no período de estio, foi similar entre as amostras de água e sedimento (D11 e D15), porém dissimilar ao período chuvoso (D03 e D07) (Gráfico 7). Fries *et al.* (2008) consideram que os sedimentos estuarinos são reservatórios críticos para espécies de *Vibrio* e que durante o período chuvoso há resuspensão desses microrganismos para a coluna d'água, o que pode afetar na diversidade da microbiota do sedimento.

Foi verificada similaridade nos perfis de espécie de *Vibrio* entre D01 e D02 e entre D09 e D10, os quais são todos referentes às amostras de água (Gráfico 7). Essa similaridade já era esperada, pois normalmente nas fazendas de carcinicultura há apenas captação, sem tratamento prévio da água do estuário adjacente (KUMAR *et al.*, 2011). Para o viveiro, a diversidade de *Vibrio* é bastante heterogênea entre a água e sedimento no período chuvoso. No entanto, no período de estio, a microbiota de *Vibrio* na água e sedimento é bastante similar.

Como sugerem Pham e Ansquer *et al.* (2014), os viveiros de cultivo de camarão apresentam uma microbiota bastante limitada devido ao recorrente uso de probióticos e aos constantes tratamentos de calagem e desinfecção antes e após cultivo. Contudo, Rao e Suredram (2013) consideram que espécies de *Vibrio* patogênicas tendem a se concentrar mais em viveiros de cultivo de camarão que em águas estuarinas, embora *V. harveyi*, que é reconhecidamente patogênico ao camarão, não tenha sido detectado nas amostras de água e sedimento dos viveiros de cultivo analisados em nosso estudo.

A presença de espécies de *Vibrio* patogênicas em águas estuarinas já foi constatada por Barbieri *et al.* (1999) e Costa *et al.* (2010). Esses autores consideram que as águas estuarinas podem veicular espécies de *Vibrio* patogênicas que podem causar problemas aos camarões cultivados. Amirmozafari *et al.* (2005) consideram que o potencial risco sanitário associado com a presença dessas bactérias no ambiente aquático enfatiza a necessidade de programas de monitoramento de longo prazo.

4.4 Susceptibilidade antimicrobiana

4.4.1 Bactérias heterotróficas cultiváveis

Das 54 cepas de bactérias heterotróficas isoladas dos meios adicionados de tetraciclina ($30 \mu\text{g.mL}^{-1}$), 16 foram consideradas resistentes com base nos resultados do ensaio de macrodiluição: concentração inibitória mínima (CIM). Já das 45 cepas de BHC isoladas dos meios adicionados de oxitetraciclina ($30 \mu\text{g.mL}^{-1}$), 17 foram consideradas resistentes com base no CIM. Para todos os isolados a CIM e a concentração bactericida mínima (CBM) foram iguais. Outrossim, todos os isolados apresentaram resistência combinada a OTC. O detalhamento das cepas consideradas resistentes (macrodiluição) para tetraciclina e oxitetraciclina são apresentados nas tabelas 16 e 17, respectivamente.

Tabela 16 - Detalhamento das cepas de bactérias heterotróficas resistentes à tetraciclina no ensaio de macrodiluição.

Código	Gênero	Período	Ponto de Coleta	Amostra	CIM/CBM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Resistência combinada a OTC	Origem
H02	<i>Vibrio</i>	Estio	Estuário	Água	32	Sim	Plasmidial
H15	<i>Vibrio</i>	Estio	Viveiro	Água	>256	Sim	Plasmidial
H17	<i>Pseudomonas</i>	Estio	Viveiro	Água	128	Sim	Plasmidial
H19	<i>Aeromonas</i>	Estio	Viveiro	Água	>265	Sim	Plasmidial
H23	<i>Vibrio</i>	Estio	Viveiro	Sedimento	>256	Sim	Cromossômica
H26	<i>Bacillus</i>	Estio	Viveiro	Sedimento	>256	Sim	Cromossômica
H35	<i>Vibrio</i>	Chuvoso	Estuário	Água	32	Sim	Plasmidial
H36	<i>Vibrio</i>	Chuvoso	Estuário	Água	32	Sim	Plasmidial
H38	<i>Enterobacter</i>	Chuvoso	Estuário	Água	32	Não	Plasmidial
H45	<i>Enterobacter</i>	Chuvoso	Viveiro	Água	128	Sim	Plasmidial
H46	<i>Enterobacter</i>	Chuvoso	Viveiro	Água	128	Sim	Plasmidial
H47	<i>Serratia</i>	Chuvoso	Viveiro	Água	>256	Sim	Plasmidial
H48	<i>Serratia</i>	Chuvoso	Viveiro	Água	>265	Sim	Plasmidial
H49	<i>Vibrio</i>	Chuvoso	Viveiro	Sedimento	128	Sim	Cromossômica
H50	<i>Vibrio</i>	Chuvoso	Viveiro	Sedimento	>265	Sim	Cromossômica
H51	<i>Pseudomonas</i>	Chuvoso	Viveiro	Sedimento	>256	Sim	Cromossômica

Tabela 17 - Detalhamento das cepas de bactérias heterotróficas resistentes à oxitetraciclina no ensaio de macrodiluição.

Código	Gênero	Período	Ponto de Coleta	Amostra	CIM/CBM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Resistência combinada a TET	Origem
H58	<i>Vibrio</i>	Estio	Estuário	Água	32	Sim	Plasmidial
H59	<i>Vibrio</i>	Estio	Estuário	Água	32	Sim	Plasmidial
H67	<i>Vibrio</i>	Estio	Viveiro	Água	>256	Sim	Plasmidial
H68	<i>Vibrio</i>	Estio	Viveiro	Água	128	Sim	Plasmidial
H70	<i>Vibrio</i>	Estio	Viveiro	Água	128	Sim	Plasmidial
H72	<i>Pseudomonas</i>	Estio	Viveiro	Água	>265	Sim	Plasmidial
H73	<i>Aeromonas</i>	Estio	Viveiro	Água	>256	Sim	Plasmidial

H79	<i>Bacillus</i>	Estio	Viveiro	Sedimento	128	Sim	Cromossômica
H85	<i>Vibrio</i>	Chuvoso	Estuário	Água	32	Sim	Plasmidial
H86	<i>Vibrio</i>	Chuvoso	Estuário	Água	32	Sim	Plasmidial
H87	<i>Enterobacter</i>	Chuvoso	Estuário	Água	32	Sim	Plasmidial
H89	<i>Vibrio</i>	Chuvoso	Estuário	Sedimento	32	Sim	Cromossômica
H93	<i>Enterobacter</i>	Chuvoso	Viveiro	Água	>256	Sim	Plasmidial
H94	<i>Enterobacter</i>	Chuvoso	Viveiro	Água	>256	Sim	Plasmidial
H95	<i>Serratia</i>	Chuvoso	Viveiro	Sedimento	>256	Sim	Cromossômica
H96	<i>Vibrio</i>	Chuvoso	Viveiro	Sedimento	>256	Sim	Cromossômica
H99	<i>Vibrio</i>	Chuvoso	Viveiro	Sedimento	>256	Sim	Cromossômica

TET:Tetraciclina; OTC: Oxitetraciclina.

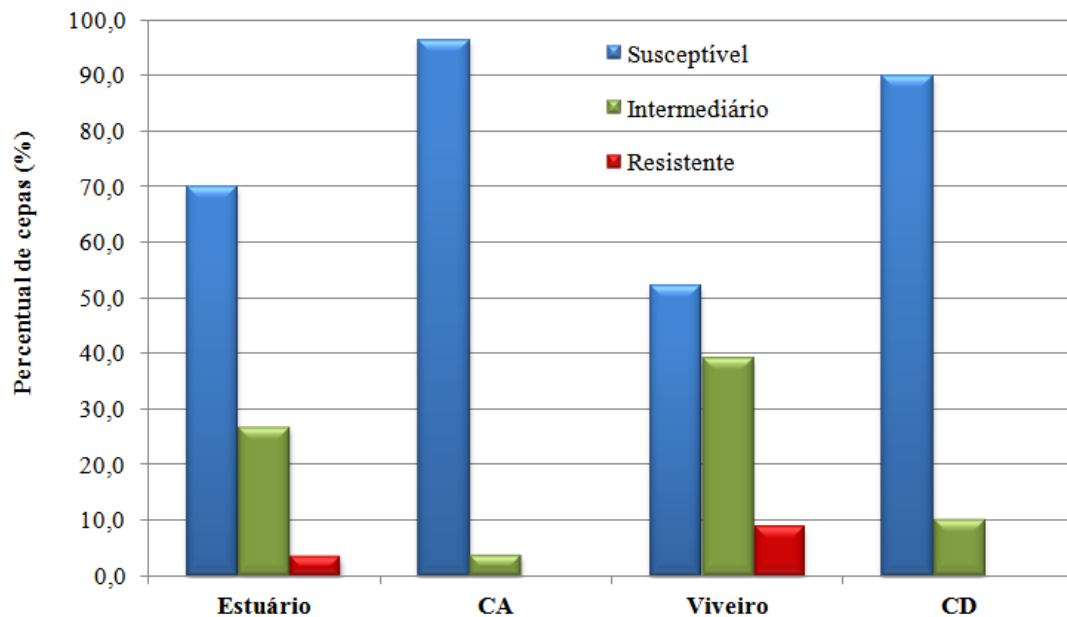
Foram detectados valores de CIM iguais ou superiores a 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para as cepas de BHC isoladas das amostras de água e sedimento do viveiro tanto para TET quanto para OTC. A partir dos ensaios de macrodiluição, não foram detectadas cepas resistentes do canal de abastecimento e do canal de drenagem. Outro fato relevante foi que a resistência plasmidial foi verificada somente para os isolados das amostras de água, o que é preocupante, devido a facilitação de disseminação de elementos de resistência.

4.4.2 *Vibrio*

Do total de 100 isolados de *Vibrio* nos quatro (4) pontos de coleta, três (3) apresentaram resistência à TET (*V.coralliilyticus*, *V.mimicus* e *V.parahaemolyticus*) e dois (2) a OTC (*V.coralliilyticus* e *V.parahaemolyticus*) pela técnica de disco-difusão de Kirby-Bauer (BAUER; KIRBY; SHERRIS, 1966) (Gráficos 8 e 9). Ao contrário do esperado, o número de cepas com resistência foi considerado baixo em relação ao total de isolados. Outrossim, após ter sido realizada cura do plasmídeo pelo agente curagênico *acridine orange* foi detectada resistência mediada por plasmídeo em todos os isolados resistentes.

Para as cepas isoladas da água e sedimento do ponto de coleta "viveiro", tanto para TET quanto para OTC, foram observados os perfis "susceptível", "intermediário" e "resistente". Além disso, o percentual de cepas com perfil intermediário à TET foi quase o mesmo daquelas com perfil susceptível. Conforme orientado pelo CLSI (2013), o perfil "intermediário" só tem significância médica, pois por definição caracteriza aquelas cepas que podem ser clinicamente tratáveis através de doses maiores de antimicrobianos. Para alguns autores, o antibiograma de cepas ambientais resultaria em apenas dois perfis fenotípicos distintos: o susceptível e o resistente. Por essa assertiva, o perfil intermediário estaria incluso no perfil resistente (WOLFENSBERGER *et al.*, 2013).

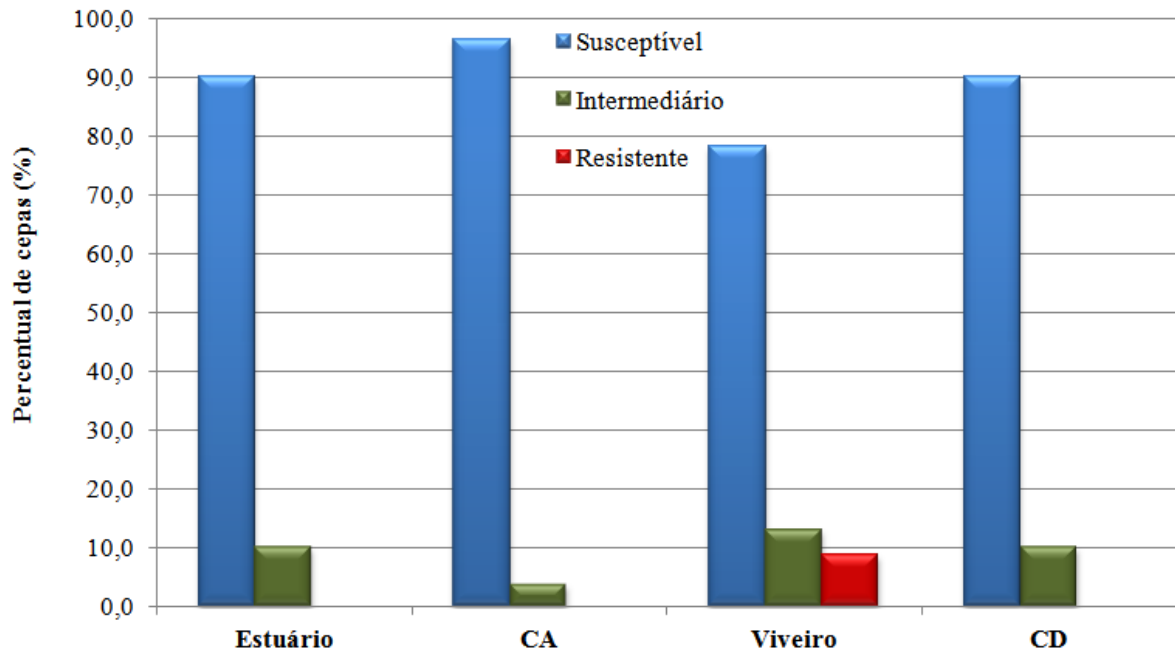
Gráfico 8 - Perfil de susceptibilidade antimicrobiana à tetraciclina das cepas de *Vibrio* isoladas da água e sedimento de fazendas de carcinicultura do estado do Ceará e Rio Grande do Norte.



CA: Canal de Abastecimento; CD: Canal de Drenagem.

Considerando o perfil de susceptibilidade antimicrobiana à oxitetraciclina, foi observado que o percentual de isolados com perfil susceptível permaneceu acima de 70% em todos os pontos de coleta. Em contrapartida, para tetraciclina, 52,2% (12) das cepas isoladas do viveiro apresentaram perfil susceptível. O percentual de cepas com perfil intermediário e resistente no ponto de coleta "viveiro", para os dois antimicrobianos analisados merece um alerta para o monitoramento contínuo desses ambientes. Outro fator que possivelmente pode explicar a baixa ocorrência de cepas com resistência é que em algumas fazendas de carcinicultura analisadas foi constatado o uso de probióticos nas rações arraçadas e na água. Como é sabido, alguns probióticos têm a capacidade de excluir, competitivamente, bactérias patogênicas, quer seja no âmbito ambiental ou no trato digestivo dos animais alimentados (HASAN *et al.*, 2012; KESARCODI-WATSON *et al.*, 2008, MOHANTY, 2001). Como não foram feitas análises desses probióticos, é possível supor-se que essa ação tenha sido, de fato, possível.

Gráfico 9 - Perfil de susceptibilidade antimicrobiana à oxitetraciclina das cepas de *Vibrio* isoladas da água e sedimento de fazendas de carcinicultura dos estados do Ceará e Rio Grande do Norte.



CA: Canal de Abastecimento; CD: Canal de Drenagem.

Com base nos valores dos diâmetros dos halos mensurados para categorização qualitativa dos perfis de susceptibilidade antimicrobiana das cepas de *Vibrio*, foi observado que mesmo a maioria das cepas sendo caracterizadas como susceptíveis, o diâmetro dos halos esteve próximo ao limite inferior (19 mm) de susceptibilidade (Gráficos 10 e 11). Tanto para TET quanto para OTC, o diâmetro máximo observado foi de 33 mm.

Vários fatores podem interferir na mensuração do diâmetro dos halos em ensaios de antibiograma, como: (1) capacidade de difusão do antimicrobiano contido no disco para o ágar, (2) a concentração do antimicrobiano utilizado, (3) a concentração do inóculo e (4) a qualidade do meio de cultura utilizado. Ao contrário do que é considerado na prospecção de substâncias com possível atividade antimicrobiana, em que a presença de qualquer halo de susceptibilidade é motivo para caracterizar essas substâncias com provável efeito inibidor, para as substâncias puras e com reconhecido potencial antimicrobiano a mensuração dos halos é padronizada e, dependendo do valor, a cepa tem seu perfil fenotípico antimicrobiano determinado (CLSI, 2013). Dessa forma, a mensuração do diâmetro dos halos além de ser uma ferramenta qualitativa pode ser inferida para o perfil antimicrobiano total da amostra

analisada.

Gráfico 10 - Número de cepas de *Vibrio* por diâmetro de halos para o antimicrobiano tetraciclina.

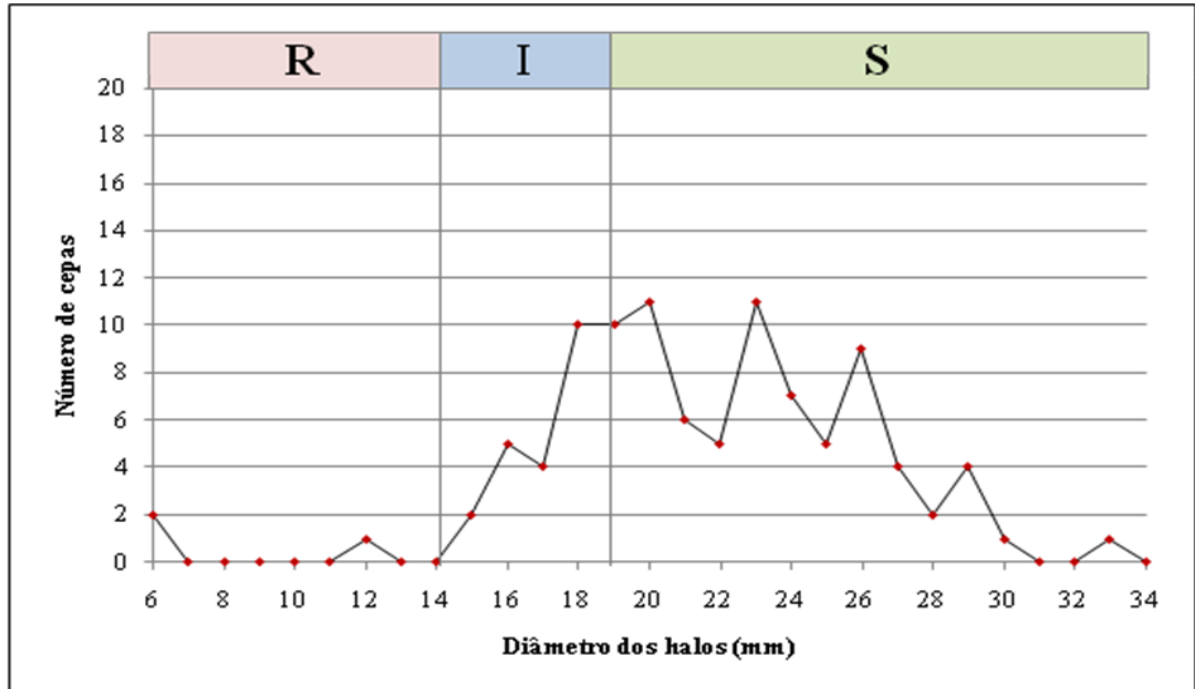
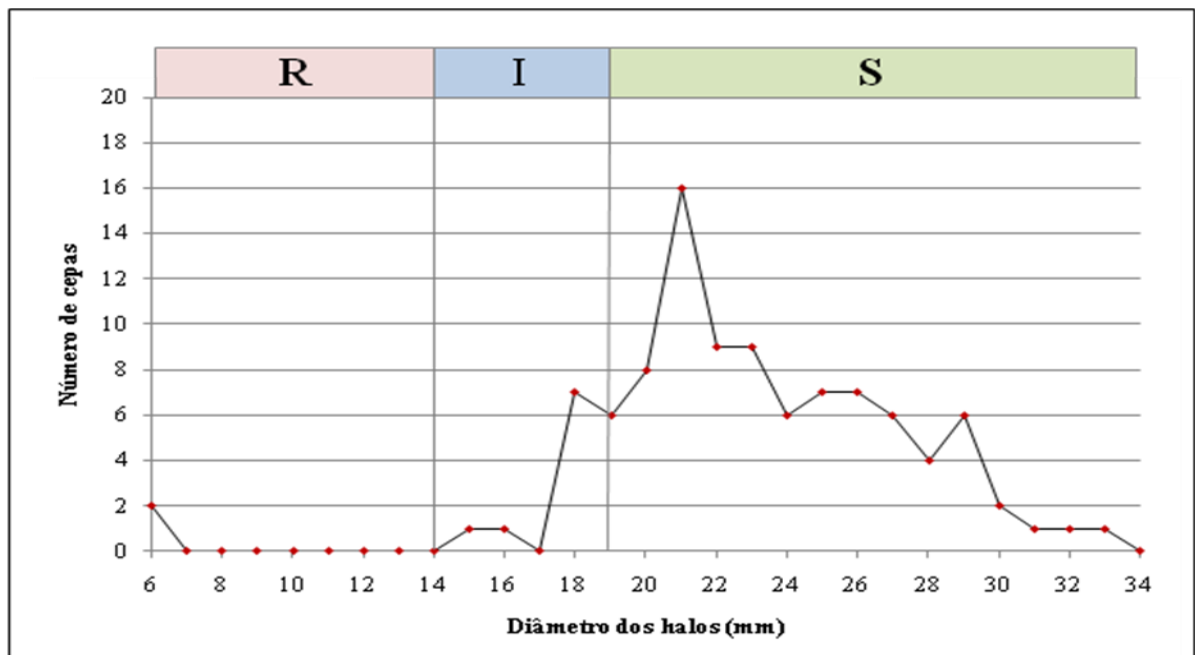


Gráfico 11 - Número de cepas de *Vibrio* por diâmetro de halos para o antimicrobiano oxitetraciclina.



Para OTC, 16 isolados apresentaram diâmetro de halo próximo a 21 mm, enquanto para TET foram observados picos para 20 e 23 mm, ambos verificados para 11 cepas. Com relação à estatística descritiva básica, por período de análise, foi observado que as cepas de *Vibrio* no período chuvoso apresentaram maior heterogeneidade de diâmetro de halos frente à tetraciclina (CV=22,28%) e oxitetraciclina (CV=19,67%) do que no período de estio: 17,43% e 16,66%, respectivamente (Tabela 18). Isso pode ser facilmente compreendido por ter sido nesse período (estio) que foram detectadas cepas resistentes à TET, das espécies *Vibrio fischeri* (1) e *Vibrio coralliilyticus* (2).

Analisando os pontos de coleta, para TET, observou-se uma maior heterogeneidade do diâmetro dos halos para as cepas isoladas do viveiro (27,85%), seguido do estuário (24,04%). Como foram observadas cepas resistentes à TET no viveiro, foi nesse ponto que foi encontrada média de diâmetro de halos menor (19,58%) aproximando-se da zona de resistência intermediária (Tabela 19). Em todos os pontos de coleta, com base nos índices de simetria e curtose, foi considerado que os diâmetros dos halos das cepas de *Vibrio*, para TET e OTC apresentaram distribuição normal (Tabela 20).

Após análise estatística foi verificado que o diâmetro dos halos para TET foi estatisticamente inferior aos diâmetros dos halos para OTC ($p < 0,05$). Esse fato pode ser explicado pela maior quantidade de cepas resistentes à tetraciclina. Com base nos períodos de análise, tanto para TET quanto para OTC verificou-se que os diâmetros dos halos das cepas de *Vibrio* no período chuvoso (quando comparadas as amostras coletadas nas fazendas nos dois períodos) foram estatisticamente superiores ao diâmetro dos halos no período de estio ($p < 0,05$). Entre os pontos de coleta, para as cepas de *Vibrio* isoladas dos viveiros foram observados diâmetros de halos (19,58 mm) para TET estatisticamente inferiores aos halos das cepas isoladas do canal de abastecimento (23,07 mm). Para OTC, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os diâmetros dos halos das cepas de *Vibrio* por pontos de coletas ($p > 0,05$).

Tabela 18 – Estatística descritiva básica do diâmetro dos halos das cepas de *Vibrio* spp frente aos antimicrobianos tetraciclina e oxitetraciclina por período de análise.

	Tetraciclina		Oxitetraciclina	
	Estio	Chuvoso	Estio	Chuvoso
Número de cepas	51	49	51	49
Média (mm)	20,56	23,14	22,02	24,69
Desvio Padrão (mm)	3,58	5,16	3,67	4,86
Variância	12,85	26,58	13,46	23,59
Coefficiente de Variação (%)	17,43	22,28	16,66	19,67

Amplitude total (mm)	20,80	27,80	19,80	26,20
Simetria	-1,09	-0,82	-1,24	-1,17
Curtose	4,02	1,47	6,45	3,37

Tabela 19 – Estatística descritiva básica do diâmetro dos halos das cepas de *Vibrio* spp frente aos antimicrobianos tetraciclina por ponto de análise.

	Estuário	CA	Viveiro	CD
Número de cepas	30	27	23	20
Média (mm)	21,96	23,07	19,58	22,52
Desvio Padrão (mm)	4,90	3,39	5,45	3,74
Variância	24,04	11,51	29,71	14,01
Coefficiente de Variação (%)	22,33	14,71	27,84	16,62
Amplitude total (mm)	21,50	13,80	21,90	13,60
Simetria	0,39	0,13	-1,04	-0,27
Curtose	-0,06	-0,33	1,94	-0,51

CA: Canal de abastecimento; CD: Canal de drenagem.

Tabela 20 – Estatística descritiva básica do diâmetro dos halos das cepas de *Vibrio* spp frente aos antimicrobianos oxitetraciclina por ponto de análise.

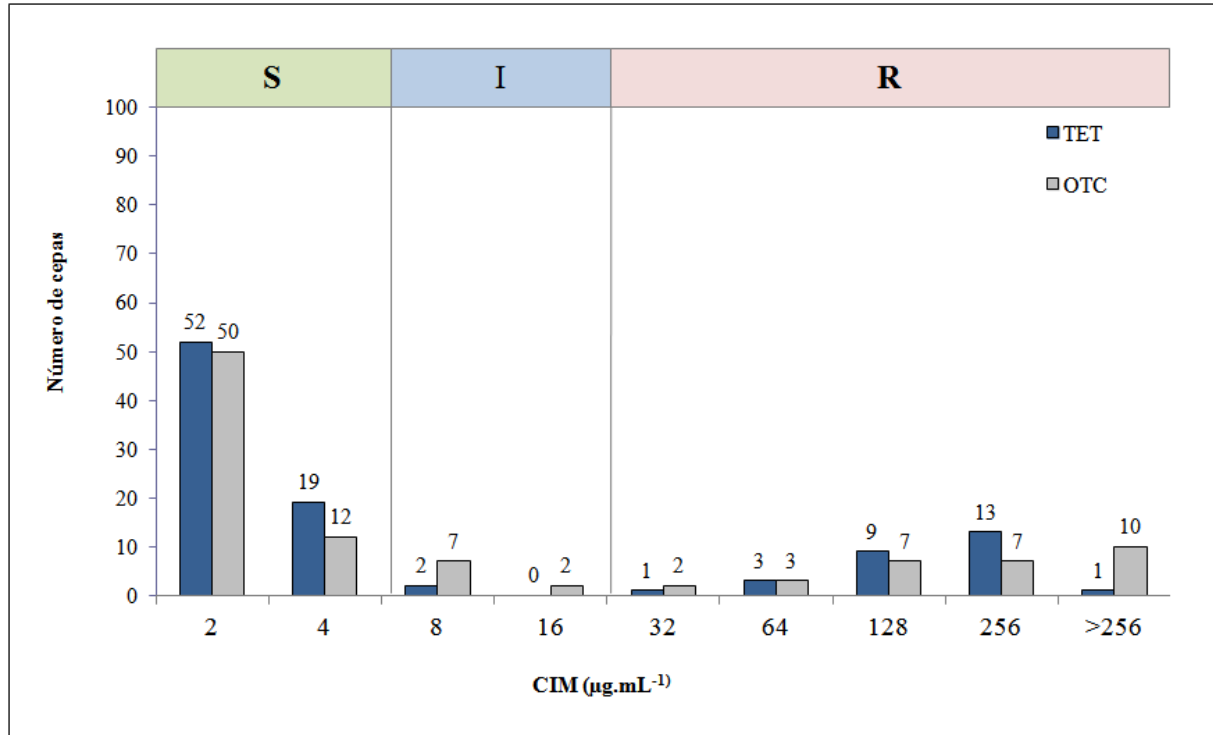
	Estuário	CA	Viveiro	CD
Número de cepas	30	27	23	20
Média (mm)	23,70	24,20	21,14	24,09
Desvio Padrão (mm)	4,03	3,52	6,02	3,60
Variância	16,27	12,40	36,25	12,93
Coefficiente de Variação (%)	22,33	14,55	28,48	14,93
Amplitude total (mm)	21,50	15,50	23,00	11,00
Simetria	0,39	0,83	-1,17	0,13
Curtose	-0,06	0,80	1,98	-0,91

CA: Canal de abastecimento; CD: Canal de drenagem.

Quanto à determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para as cepas de *Vibrio* spp., 71 isolados apresentaram-se susceptíveis a TET, enquanto 63 a OTC, respectivamente (Gráfico 12). Dessa forma, 29 cepas foram consideradas resistentes a OTC, enquanto 27 a TET. Fazendo uma comparação com a técnica de disco-difusão de Kirby-Bauer, o número de cepas consideradas resistentes, pela análise da CIM, foi superior. Dessas, 10 isolados resistentes a OTC tiveram CIM superior a 256 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Em estudo feito por Rocha (2011) com cepas de *Vibrio* isoladas de ambiente de carcinicultura, o autor encontrou cepas com resistência superior a 15% dos isolados tanto para tetraciclina quanto para oxitetraciclina. Nesse contexto, Han *et al.*, (2007) e Shaw *et al.* (2014) consideram que a recorrência de cepas com CIM alta representa risco para a comunidade microbiana marinha e estuarina. O detalhamento das cepas com resistência à tetraciclina e oxitetraciclina (ou

combinada) é apresentado na tabela 21.

Gráfico 12 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antimicrobianos tetraciclina (TET) e oxitetraciclina (OTC) para as cepas de *Vibrio* spp isoladas da água e sedimento de fazendas de carcinicultura do estado do Ceará e do Rio Grande do Norte.



Em se tratando de cepas ambientais, são utilizados os valores estipulados pelo CLSI para conclusão dos resultados. Mesmo a macrodiluição em caldo sendo uma técnica mais laboriosa que a técnica de disco-difusão, é a que oferece resultados mais completos, uma vez que não só é estabelecido o perfil de susceptibilidade antimicrobiana como também há determinação da menor concentração do antimicrobiano que inibe a bactéria alvo (CIM).

Assim como ocorreu para as demais BHC, foi verificado que as cepas de *Vibrio* resistentes isoladas da água apresentaram resistência plasmidial (neste caso tanto para TET quanto para OTC), enquanto as do sedimento tiveram origem exclusivamente cromossômica. Foram verificados isolados resistentes em todos os pontos de coleta pesquisados (Tabela 21).

Tabela 21 - Detalhamento da cepas de *Vibrio* resistentes à tetraciclina e à oxitetraciclina no ensaio de macrodiluição.

Código	Espécie	Período	Ponto de Coleta	Amostra	Resistência	Origem
V17	<i>V.alginolyticus</i>	Estio	Estuário	Sedimento	OTC	C
V18	<i>V.parahaemolyticus</i>	Estio	Canal de Abastecimento	Sedimento	OTC	C

V19	<i>Vibrio tasmaniensis</i>	Estio	Canal de drenagem	Água	TET+OTC	P/P
V37	<i>Vibrio fisheri</i>	Estio	Viveiro	Água	TET+OTC	P/P
V57	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Chuvoso	Viveiro	Água	TET+OTC	P/P
V58	<i>Vibrio coralliilyticus</i>	Chuvoso	Viveiro	Água	TET+OTC	P/P
V60	<i>Vibrio coralliilyticus</i>	Chuvoso	Viveiro	Água	TET+OTC	P/P
V61	<i>Vibrio harveyi</i>	Chuvoso	Estuário	Água	TET+OTC	P/P
V62	<i>Vibrio diabolicus</i>	Chuvoso	Estuário	Água	TET+OTC	P/P
V64	<i>Vibrio littoralis</i>	Chuvoso	Estuário	Sedimento	TET+OTC	C/C
V65	<i>Vibrio diabolicus</i>	Chuvoso	Estuário	Sedimento	TET+OTC	C/C
V66	<i>Vibrio diabolicus</i>	Chuvoso	Canal de drenagem	Água	TET+OTC	P/P
V68	<i>Vibrio mimicus</i>	Chuvoso	Canal de drenagem	Água	TET+OTC	P/P
V69	<i>Vibrio coralliilyticus</i>	Chuvoso	Canal de Abastecimento	Água	TET+OTC	P/P
V70	<i>Vibrio coralliilyticus</i>	Chuvoso	Viveiro	Água	TET+OTC	P/P
V71	<i>Vibrio coralliilyticus</i>	Chuvoso	Viveiro	Água	TET+OTC	P/P
V72	<i>Vibrio coralliilyticus</i>	Chuvoso	Viveiro	Água	TET+OTC	P/P
V73	<i>Vibrio coralliilyticus</i>	Chuvoso	Viveiro	Sedimento	TET+OTC	C/C
V77	<i>Vibrio coralliilyticus</i>	Chuvoso	Canal de drenagem	Água	TET+OTC	P/P
V81	<i>Vibrio diabolicus</i>	Chuvoso	Canal de Abastecimento	Água	TET+OTC	P/P
V83	<i>Vibrio coralliilyticus</i>	Chuvoso	Canal de Abastecimento	Água	TET+OTC	P/P
V85	<i>Vibrio coralliilyticus</i>	Chuvoso	Canal de Abastecimento	Água	TET+OTC	P/P
V89	<i>Vibrio coralliilyticus</i>	Chuvoso	Estuário	Água	TET+OTC	P/P
V90	<i>Vibrio diabolicus</i>	Chuvoso	Estuário	Água	TET+OTC	P/P
V93	<i>Vibrio mimicus</i>	Chuvoso	Estuário	Água	TET+OTC	P/P
V94	<i>Vibrio coralliilyticus</i>	Chuvoso	Estuário	Água	TET+OTC	P/P
V97	<i>Vibrio mimicus</i>	Chuvoso	Estuário	Água	TET+OTC	P/P
V98	<i>Vibrio calviensis</i>	Chuvoso	Canal de Abastecimento	Água	TET+OTC	P/P
V100	<i>Vibrio coralliilyticus</i>	Chuvoso	Viveiro	Água	TET+OTC	P/P

TET:Tetraciclina; OTC: Oxitetraciclina.

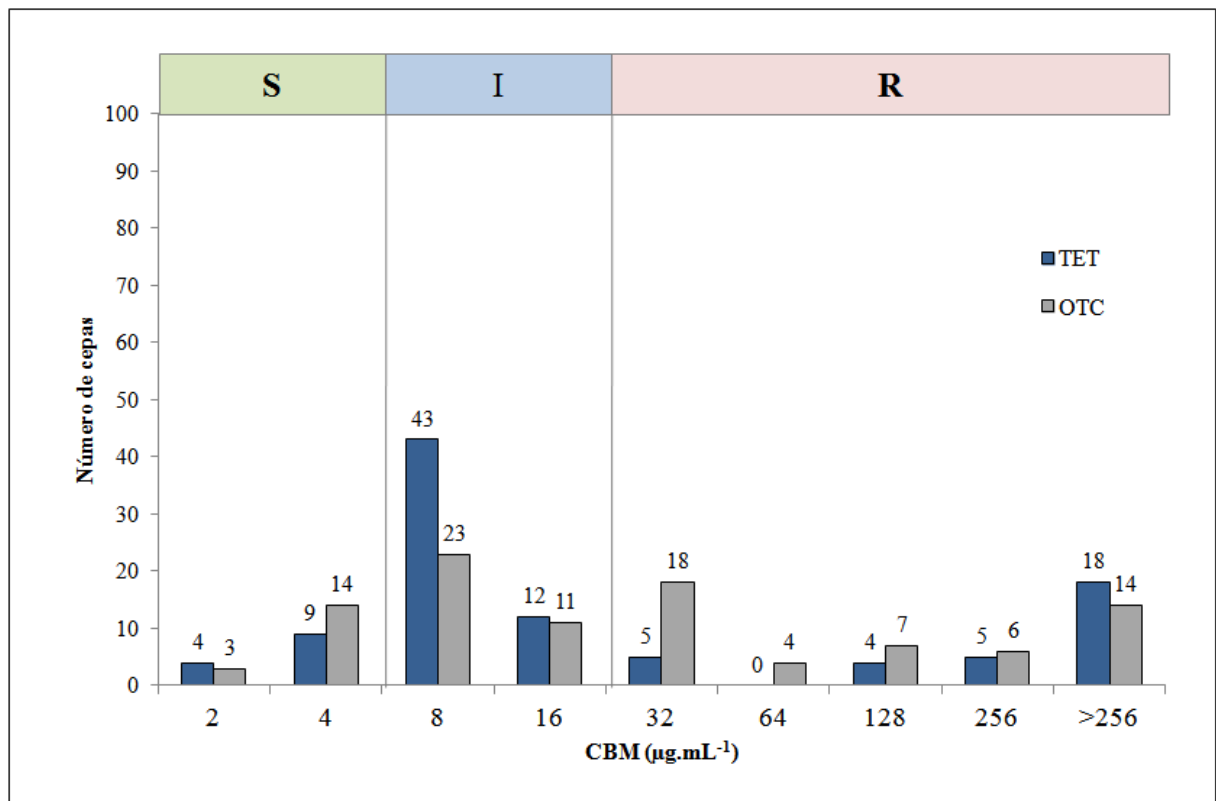
C: Cromossômica; P: Plasmidial.

Estudos que traçam o comparativo entre as técnicas fenotípicas de disco-difusão de Kirby-Bauer e Macrodiluição em caldo são escassos, principalmente para cepas ambientais. Por outro lado, para cepas clínicas é reconhecido que dependendo da espécie bacteriana analisada e do antimicrobiano utilizado uma ou outra técnica será mais eficaz. Esse fato tem sido comprovado para cepas de *Staphylococcus aureus* frente ao antimicrobiano vancomicina (5 µg), que pela técnica de disco-difusão pode gerar resultados errôneos devido ao fato deste fármaco não se difundir facilmente (e nas concentrações adequadas) no ágar. Logo, nesse supracitado caso, a determinação da CIM pelo método de macrodiluição em caldo é a que oferece melhores resultados (PRAKASH; LEWIS; JORGENSEN, 2008).

Além da determinação da CIM dos antimicrobianos para as cepas de *Vibrio*, foi estabelecida a Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos antimicrobianos. Para TET e OTC foram verificadas 18 e 14 cepas, respectivamente, com CBM superior a 256 µg.mL⁻¹ (Gráfico 13). Foram verificadas cepas com CBM de 2 µg.mL⁻¹ a TET e OTC. Este fato chama a atenção e comprova que para essas cepas com CBM tão baixa, a menor concentração do antimicrobiano já é suficiente para causar o efeito bactericida. Dessa forma, esses resultados

são de sumária importância, pois é sabido que o uso indiscriminado de antimicrobianos em carcinicultura ocorre sem o conhecimento da concentração usada (SWAPNA; RAJESH; LAKSHMANAN, 2012). Além disso, alguns resíduos de antimicrobianos persistem por mais tempo no ambiente, causando seleção da microbiota ali presente por seu efeito sub-letal.

Gráfico 13 - Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos antimicrobianos tetraciclina (TET) e oxitetraciclina (OTC) para as cepas de *Vibrio* spp isoladas da água e sedimento de fazendas de carcinicultura dos estados do Ceará e do Rio Grande do Norte.



Alguns autores consideram que a resistência antimicrobiana é uma característica que é principalmente mediada por estruturas genéticas acessórias, tais como os plasmídeos. Por essa assertiva, é conclusivo supor que os micro-organismos demandam energia para manter essas estruturas genéticas sempre funcionais. O isolamento de cepas com resistência às tetraciclina de ambientes aquáticos supõe que esses antimicrobianos foram recentemente usados (NEELA, NONAKA, SUZUKI, 2007). Do contrário, será observada uma maior recorrência de cepas com perfil antimicrobiano susceptível.

Embora os estudos fenotípicos sejam importantes para se traçar um perfil quantitativo da microbiota resistente, somente os estudos genotípicos oferecem a ferramenta conclusiva para se determinar se, de fato, as cepas apresentam estruturas genéticas que lhe

possam conferir o fenótipo de resistência. Em contrapartida, os estudos genéticos, mesmo que definitivamente conclusivos, não expressam de forma mensurável as características básicas que norteiam o perfil de resistência antimicrobiana, como por exemplo, a concentração do antimicrobiano apropriada para o efeito bactericida.

Quando comparados os resultados do método de disco-difusão (diâmetro dos halos) com os respectivos resultados e a CIM (método de macrodiluição em caldo) foram verificadas algumas incoerências tanto para o perfil de TET quanto de OTC (Gráficos 14 e 15). Segundo o CLSI (2010), as cepas que apresentassem, no ensaio de antibiograma para as tetraciclinas, diâmetro de halo inferior a 14 mm eram consideradas resistentes, assim como as que apresentassem CIM superior a $16 \mu\text{g. mL}^{-1}$. Por essa assertiva, das três (3) cepas resistentes à TET, duas (2) delas apresentaram CIM de $2 \mu\text{g. mL}^{-1}$, enquanto para OTC das duas (2) cepas resistentes, uma (1) apresentou CIM de $2 \mu\text{g. mL}^{-1}$.

Para as cepas com perfil susceptível no ensaio de disco-difusão, algumas apresentaram perfil de resistência no ensaio de macrodiluição. Heijden *et al.* (2007) ressaltam a importância de se realizar testes comparativos entre as técnicas de susceptibilidade antimicrobiana, inclusive para antimicrobianos de reconhecida eficiência. Já Gaudreau *et al.* (2008) consideram o teste de macrodiluição para as tetraciclinas como o mais eficiente. Em contrapartida, Singh *et al.* (2012) esclarecem que os direcionamentos apontados pelo CLSI apenas são orientações que estão sujeitas à mudanças, caso seja necessário.

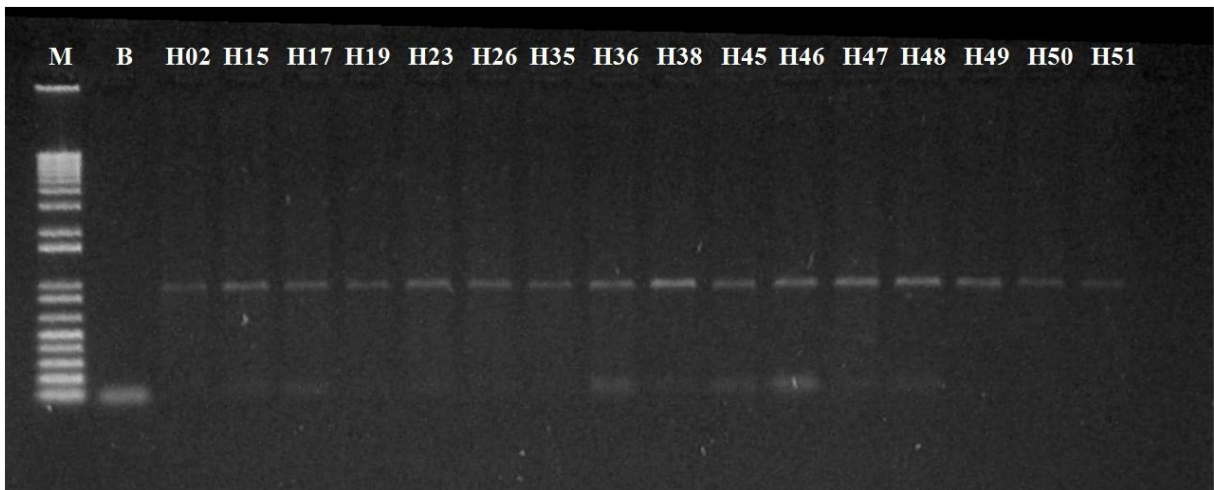
Para esses casos em que foi verificada diferença no perfil antimicrobiano entre as técnicas de disco-difusão e macrodiluição, somente os ensaios genotípicos podem esclarecer, de fato, se há genes de resistência aos antimicrobianos testados. Ademais, caso esses genes estejam presentes, faz-se necessário verificar os mecanismos que podem influenciar a expressão, *in vitro*, do fenótipo de resistência (CORONA; MARTINEZ, 2013).

4.5 Testes genotípicos

4.5.1 Bactérias heterotróficas cultiváveis

A presença do gene *tet(M)* foi confirmada para as 16 cepas de bactérias heterotróficas com resistência fenotípica no ensaio de macrodiluição (Figura 8). Os demais isolados de BHC (41), não resistentes no ensaio de macrodiluição, não apresentaram o gene *tet(M)*. O gene *tet(M)* é um determinante de resistência bastante relatado na literatura. Para Zhang *et al.* (2009), esse gene de resistência é comum em bactérias da família Enterobacteriaceae e em *Vibrio*, tendo seu mecanismo de resistência relacionado à inibição da síntese protéica bacteriana. Nenhum dos isolados apresentou o gene de resistência *tet(S)*. Esse gene tem sido associado como determinante de resistência apenas em cepas de *Citrobacter* e *Veillonella* (SRINIVASAN *et al.*, 2008), que não foram detectadas neste estudo.

Figura 8 - Detecção do gene *tet(M)* (656 pb) para as cepas de bactérias heterotróficas fenotipicamente caracterizadas como resistentes à tetraciclina.



B: controle negativo..

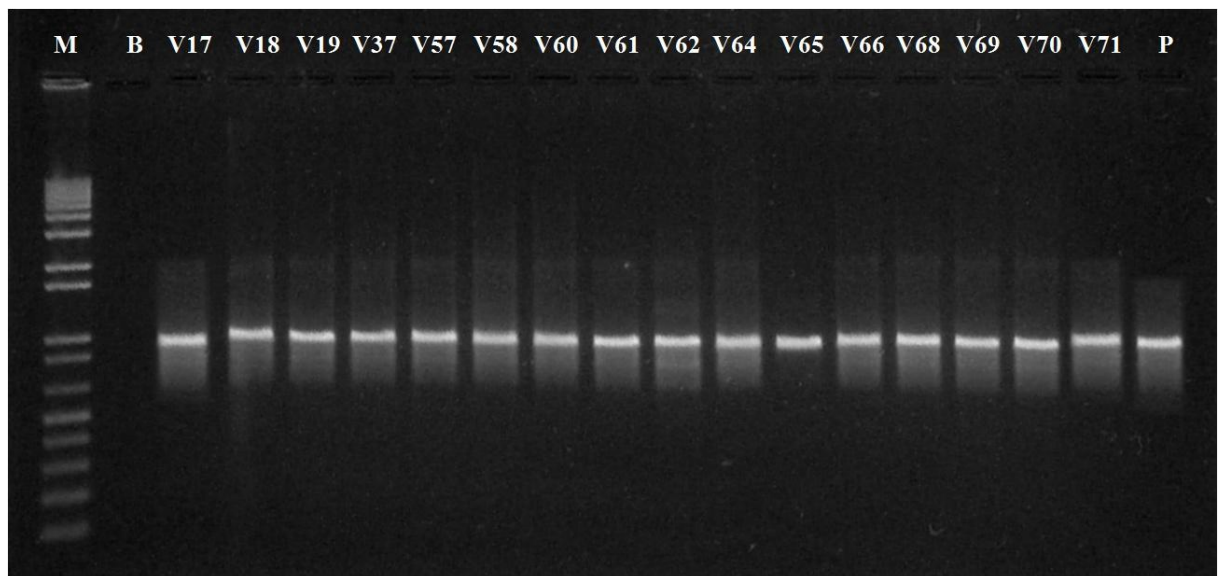
A detecção de determinantes de resistência em cepas de diferentes gêneros (*Aeromonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Vibrio*), em ambiente de carcinicultura, representa um risco, principalmente, pela maior associação às cepas do gênero *Vibrio*, as quais são abundantes em águas marinhas e estuarinas e reconhecidos patógenos do camarão cultivado. Entretanto, os determinantes de resistência à oxitetraciclina: *otr(A)* e *otr(B)* não foram evidenciados nas cepas, fenotipicamente, caracterizadas como resistentes (disco-difusão e macrodiluição). O mecanismo de resistência conferido por esses genes ainda

não é completamente esclarecido, mas é conhecido que ambos têm seu mecanismo de expressão engatilhado pelos genes *tet(O)* e *tet(M)* (CHOPRA, 2001; KISELKOVA *et al.*, 2012). Acredita-se, portanto, que o fenótipo de resistência das cepas desse estudo à oxitetraciclina tenha sido expressado por outro gene da classe *otr* ou pelos próprios *tet(O)* e *tet(M)*.

4.5.2 *Vibrio*

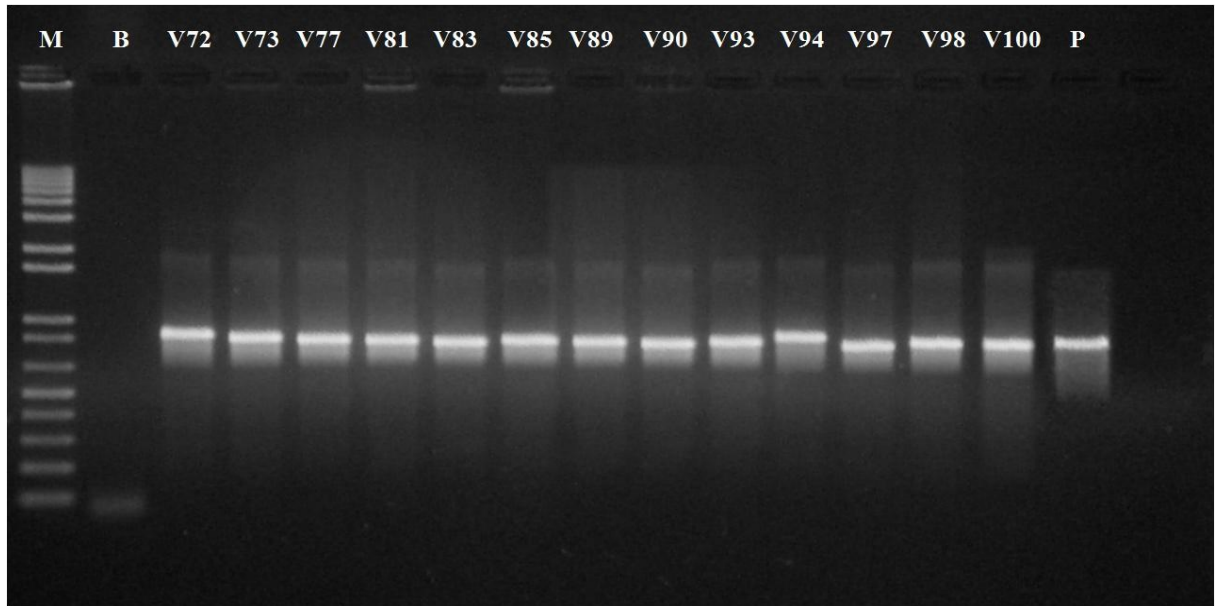
Todas as 29 cepas fenotipicamente caracterizadas como *Vibrio*, com resistência a tetraciclina ou oxitetraciclina, foram confirmadas no teste genotípico (Figuras 9 e 10). Esses dados sugerem que a chave bioquímica proposta por Noguera e Blanch (2008) foi eficiente para identificação das cepas ao nível de gênero. Entretanto, nesse estudo, não foram realizados ensaios para verificação da eficiência da referida chave bioquímica para identificação ao nível de espécie.

Figura 9 - Eletroforese uniplex dos isolados fenotipicamente identificados como *Vibrio* para confirmação genotípica de gênero: cepas V17 a V71 ao gene *vib* (650 pb).



M: marcador. B: controle negativo. P: controle positivo.

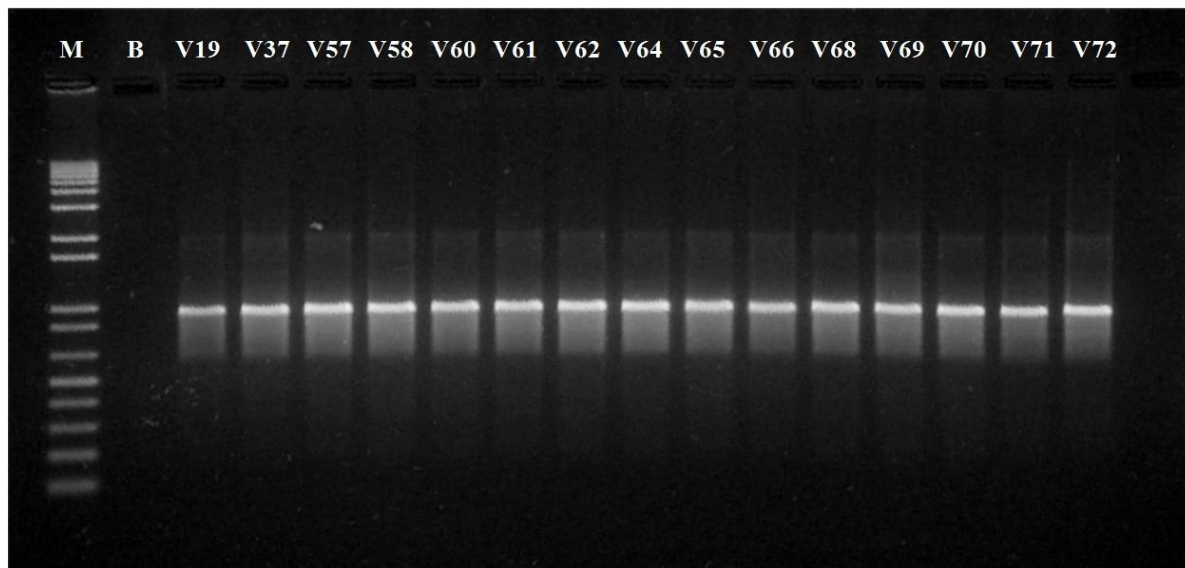
Figura 10 - Eletroforese uniplex dos isolados fenotipicamente identificados como *Vibrio* para confirmação genotípica de gênero: cepas V72 a V100 ao gene *vib* (650 pb).



M: marcador. B: controle negativo. P: controle positivo.

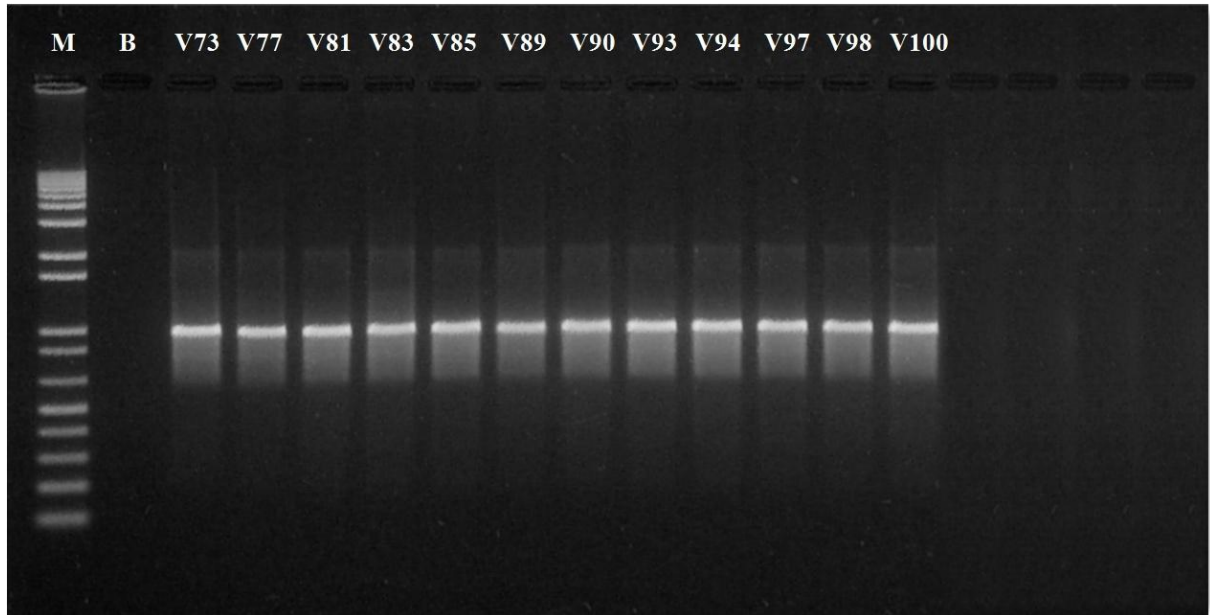
Após o ensaio genotípico das 27 cepas de *Vibrio* com resistência à tetraciclina, foi verificado que todos os isolados apresentaram o gene *tet(M)* (Figuras 11 e 12), entretanto o gene *tet(S)* não foi detectado. Dessa forma, foi comprovado que os ensaios de macrodiluição foram precisos para a identificação do fenótipo de resistência, o qual foi comprovado pela presença do determinante de resistência *tet(M)*.

Figura 11 - Detecção do gene *tet(M)* (656 pb) para as cepas de *Vibrio* (V19 a V72) fenotipicamente caracterizadas como resistentes à tetraciclina.



M: marcador. B: controle negativo.

Figura 12 - Detecção do gene *tet(M)* (656 pb) para as cepas de *Vibrio* (V73 a V100) fenotipicamente caracterizadas como resistentes à tetraciclina.



M: marcador. B: controle negativo.

Assim como ocorreu para as outras bactérias heterotróficas, não foram detectados os genes *otr(A)* e *otr(B)* nos isolados de *Vibrio*, o que sugere que o fenótipo resistência à oxitetraciclina para essas cepas seja expresso por outros genes. Provavelmente, a positividade no teste de difusão em disco não foi expressa pelos *primers* usados na pesquisa. Contudo, como detalhado em tabela anterior (Tabela 21), 27 cepas compartilharam o fenótipo de resistência a TET e OTC simultaneamente (macrodiluição) e, considerando que o gene *tet(M)* foi evidenciado por todas elas, pressupõe-se que essa característica genotípica já seja um fator de risco para perpetuação do fenótipo de resistência de *Vibrio* no ambiente de carcinicultura.

5 CONCLUSÕES

- Foi comprovada a hipótese de que *Vibrio* é o micro-organismo mais abundante dentre as bactérias heterotróficas com resistência às tetraciclinas em ambiente de criação de camarão.
- A quantificação de bactérias heterotróficas cultiváveis resistentes à tetraciclina é influenciada pela variável salinidade
- A diversidade de bactérias heterotróficas é influenciada pelos períodos de estio e chuvoso e também pelos diferentes pontos de coleta dentro das fazendas de carcinicultura.
- Embora a diversidade de BHC tenha sido maior nas amostras de água e sedimento dos viveiros, a diversidade de espécies de *Vibrio* foi menor, o que comprova a dominância de uma espécie em relação à outra.
- Os ensaios de macrodiluição foram mais eficientes na determinação do fenótipo de resistência em *Vibrio* e demais BHC.
- O gene determinante de resistência *tet(M)* foi o mais associado às cepas de *Vibrio* e demais BHC com fenótipo de resistência nos ensaios de macrodiluição
- Os genes de resistência à oxitetraciclina: *otr(A)* e *otr(B)* e à tetraciclina: *tet(S)* não foram evidenciados dentre os isolados.
- O aumento do isolamento de cepas resistentes às tetraciclinas em diferentes fazendas de carcinicultura comprova o uso constante desses antimicrobianos durante o cultivo.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A problemática no uso de antimicrobianos em cultivo de organismos aquáticos é uma preocupação mundial. Essas substâncias são utilizadas por serem, em sua maioria, mais baratas, terem resultado a curto prazo e não haver rigidez no controle legal de uso e comercialização na maioria dos países. Por isso, medidas de controle no uso de substâncias antimicrobianas devem ser estabelecidas, considerando-se a classe dos antimicrobianos, o micro-organismo alvo, a dose satisfatória e a espécie aquícola cultivada. Para isso, mais estudos devem ser incentivados com o objetivo de se traçar um perfil atualizado do uso de substâncias antimicrobianas no cultivo de camarões no Brasil. Somente a partir desses estudos será possível se estabelecer metas para o desuso ou controle legal dessas substâncias em cultivo de organismos aquáticos.

REFERÊNCIAS

- AALIPOUR, F.; MIRLOHI, M.; JALALI, M. Determination of antibiotic consumption index for animal originated foods produced in animal husbandry in Iran, 2010. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 12, n. 42, p.1-7. Jan 2014.
- AKINBOWALE, O. L.; PENG, H.; BARTON, M. D. Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from aquaculture sources in Australia. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 5, p. 2016-2025, Nov 2007.
- AL-HARBI, A. H.; UDDIN, M. N. Quantitative and qualitative study of the bacterial flora of farmed freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergi*) larvae. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 20, p. 461-465. Oct 2004.
- AMIRMOZAFARI, N.; FOROHESH, H.; HALACOO, A. Occurrence of pathogenic *Vibrios* in coastal areas of Golestan province in Iran. **Archives of Razi Institute**, v. 60, p. 33-44, Nov 2005.
- ANAND, R. *et al.* Occurrence and distribution of *Clostridium perfringens* in relation to conventional faecal indicator bacterial in shrimp farm. **Asian Journal of Biology Science**, v. 3, p. 2, p. 361-363, Oct 2008.
- ANDERSEN, W. C. *et al.* Determination of tetracycline residues in shrimp and whole milk using liquid chromatography with ultraviolet detection and residue confirmation by mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 529, n. 1-2, p. 145-150, Jan 24 2005.
- APPLE, J. K.; SMITH, E. M.; BOYD, T. J. Temperature, Salinity, Nutrients, and the Covariation of Bacterial Production and Chlorophyll-a in Estuarine Ecosystems. **Journal of Coastal Research**, West Palm Beach, v. 55, p. 59-75. Jan 2008.
- ARANA, L. V. **Princípios químicos da qualidade da água em aquicultura**. Editora da UFSC: Florianópolis, 1999. 166p.
- AWATA, T.; TANABE, K.; KINDAICHI, T.; OZAKI, N.; OHASHI, A. Influence of temperature and salinity on microbial structure of marine anammox bacteria. **Water Science and Technology**, London, v. 66, n. 5, p. 958-964, Feb 2012.
- BAGUER, A. J.; JENSEN, J.; KROGH, P. H. Effects of the antibiotics oxytetracycline and tylosin on soil fauna. **Chemosphere**, Oxford, v. 40, p. 751-757. Apr 2000.
- BANERJEE, S. *et al.* Antibiotic Resistant Salmonella and *Vibrio* Associated with Farmed *Litopenaeus vannamei*. **Scientific World Journal**, 2012 2012.
- BAQUERO, F.; MARTINEZ, J.-L.; CANTON, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 260-265, Jun 2008.
- BARBIERI JÚNIOR, R.C.; OSTRENSKY NETO, A. Camarões marinhos: engorda. Viçosa: Aprenda Fácil, 2002. v.2, 352p.

BARBIERI, E.; FALZANO, L.; FIORENTINI, C.; PIANETTI, A.; BAFFONE, W.; FABBRI, A.; MATARRESE, P.; CASIERE, A.; KATOULI, M.; KEUHN, I.; MEOLLBY, R.; BRUSCOLINI, F.; DONELLI, G. Occurrence, diversity, and pathogenicity of halophilic *Vibrio* spp. and non-O1 *Vibrio cholerae* from estuarine waters along the Italian Adriatic Coast. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 6, p. 2748–2753, June 1999.

BARRAZA-GUARDADO, R. H. *et al.* Effluents of Shrimp Farms and Its Influence on the Coastal Ecosystems of Bahia de Kino, Mexico. **Scientific World Journal**, v. 3. p. 1-6, Oct 2013.

BATICADOS, M. C. L.; LAVILLAPITOGO, C. R.; CRUZLACIERDA, E. R.; DELAPENA, L. D.; SUNAZ, N. A. Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio-harveyi* and *Vibrio splendidus* isolated from diseased *Penaeus-monodon* larvae and rearing water. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf Luhe, v. 9, p. 133-139. Oct 1990.

BATT, A. L.; AGA, D. S. Simultaneous analysis of multiple classes of antibiotics by ion trap LC/MS/MS for assessing surface water and groundwater contamination. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 77, n. 10, p. 2940-2947, May 2005.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, Chicago, v. 45, p. 493. 1966.

BEARDSLEY, C.; MOSS, S.; MALFATTI, F.; AZAM, F. Quantitative role of shrimp fecal bacteria in organic matter fluxes in a recirculating shrimp aquaculture system. **Fems Microbiology Ecology**, Malden, v. 77, p. 134-145. Jul 2011.

BEN-HAIM, Y.; THOMPSON, F. L.; THOMPSON, C. C.; CNOKAERT, M. C.; HOSTE, B.; SWINGS, J.; ROSEMBERG, E. *Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 53, n. 1, p. 309-315, Jan 2003.

BEN-HAIM, Y.; ZICKERMAN-KEREN, M.; ROSENBERG, E. Temperature-regulated bleaching and lysis of the coral *Pocillopora damicornis* by the novel pathogen *Vibrio coralliilyticus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 7, p. 4236-4242, July 2003.

BENNETT, P. M. Plasmid encoded antibiotic resistance: Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. **British Journal Pharmacology**, London, v. 153, Suppl. 1, p. S347-S357, Mar 2008.

BERENDONK, T. U. *et al.* Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 310-317, May 2015.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 523-530, Jul-Ago 2003.

BJORKLUND, H. V.; BYLUND, G. Comparative pharmacokinetics and bioavailability of oxolinic acid and oxytetracycline in rainbow-trout (*Oncorhynchus-mykiss*). **Xenobiotica**, London, v. 21, p. 1511-1520. Nov 1991.

BOINAPALLY, K.; JIANG, X. Comparing antibiotic resistance in commensal and pathogenic bacteria isolated from wild-caught South Carolina shrimps vs. farm-raised imported shrimps. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 7, p. 919-924, Jul 2007.

CARVALHO, F. C. T.; OSCARINA V. SOUSA, O. V.; CARVALHO, E. M. R.; HOFER, E.; VIEIRA, R. H. S. F. Antibiotic Resistance of Salmonella spp. Isolated from Shrimp Farming Freshwater Environment in Northeast Region of Brazil. **Journal of Pathogens**, v. 2013, p. 1-5. Nov 2013.

CAVALCANTI, J. R. **Semi-árido brasileiro**. Rio de Janeiro. 184 p.

CERVINO, J. M.; HAYES, R. L.; POLSON, S. W.; POLSON, S. C.; GOREAU, T. J.; MARTINEZ, R. J.; SMITH, G. W. Relationship of *Vibrio* species infection and elevated temperatures to Yellow Blotch/Band disease in Caribbean corals. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 11. p. 6855–6864, Nov 2004.

CHASE, E.; HARWOOD, V. J. Comparison of the Effects of Environmental Parameters on Growth Rates of *Vibrio vulnificus* Biotypes I, II, and III by Culture and Quantitative PCR Analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 12, p. 4200-4207, Jun 2011.

CHATTERJEE, S.; HALDAR, S. *Vibrio* related diseases in aquaculture and development of rapid and accurate identification methods. **Journal of Marine Science: Research & Development**, v. S:1, n. 002, p. 1-7, 2012.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 2, p. 232+, Jun 2001.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria**. M45A. CLSI: Wayne. 2005. 68p.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement**. M100-S23. CLSI: Wayne, v. 33, n.1. 2013. 205 p.

CONNELL, S. R.; TRIEBER, C. A.; STELZL, U.; EINFELDT, E.; TAYLOR, D. E.; NIERHAUS, K. H., The tetracycline resistance protein Tet(O) perturbs the conformation of the ribosomal decoding centre. **Molecular Microbiology**, v. 45, p. 1463-1472. 2002.

CORONA, F.; MARTINEZ, J. L. Phenotypic resistance to antibiotics. **Antibiotics**, v. 2, p. 237-255, 2013.

COSTA, R. A. *et al.* Antibiotic-Resistant *Vibrios* in Farmed Shrimp. **Biomed Research International**, 2015 2015.

COSTA, R. A.; ARAUJO, R. L.; VIEIRA, R. H. RAW TROPICAL OYSTERS AS VEHICLES FOR MULTIDRUG-RESISTANT *Vibrio* parahaemolyticus. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo**, v. 57, n. 3, p. 193-196, May-Jun 2015.

- COSTA, S. W.; VICENTE, L. R. M.; SOUZA, T. M.; ANDREATTA, E. R.; MARQUES, M. R. F. Parâmetros de cultivo e a enfermidade da mancha-branca em fazendas de camarões de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 12, p.1521-1520. Dez 2010.
- COURVALIN, P. Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 38, n. 7, p. 1447-1451, July 1994.
- COUTINHO, F. H. *et al.* Antibiotic Resistance is Widespread in Urban Aquatic Environments of Rio de Janeiro, Brazil. **Microbial Ecology**, v. 68, n. 3, p. 441-452, Oct 2014.
- DAGHRIR, R.; DROGUI, P. Tetracycline antibiotics in the environment: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 11, n. 3, p. 209-227, Sep 2013.
- DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417-+, Sep 2010.
- DE SCHRYVER, P.; DEFOIRDT, T.; SORGELOOS, P. Early Mortality Syndrome Outbreaks: A Microbial Management Issue in Shrimp Farming? **Plos Pathogens**, v. 10, n. 4, Apr 2014.
- DECAMP, O.; MORIARTY, D. J. W. Probióticos como alternativas anti-microbiana: limitações e potencial. **Revista da ABCC**, Recife, v. 2, n.4, p. 58-59, June 2005.
- DEPARDIEU, F. I. P.; LECLERCQ, R.; COLLATZ, E.; COURVALIN, P. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 20, n. 1, p. 79-114, Jan 2007.
- DETER, J. *et al.* Ecology of pathogenic and non-pathogenic *Vibrio* parahaemolyticus on the French Atlantic coast. Effects of temperature, salinity, turbidity and chlorophyll a. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 929-937, Apr 2010.
- DOENHOEFER, A. *et al.* Structural basis for TetM-mediated tetracycline resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 42, p. 16900-16905, Oct 16 2012.
- DSMZ. **Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH German Collection of Microorganisms and Cell Cultures – *Vibrio***. Disponível em: <<http://www.dsmz.de/microorganisms/html/bacteria.genus/Vibrio.html>> Acesso em: 6 Mai 2014.
- DZIDIC, S.; SUSKOVIC, J.; KOS, B. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Biochemical and genetic aspects. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 11-21, Jan-Mar 2008.
- EUCAST. European Committee of Antimicrobial Susceptibility Test. **MIC distributions**. Disponível em: < http://www.eucast.org/mic_distributions/> Acesso em 12 de maio de 2014.
- FABIAN, N.; STAROSTA, A. L.; ARENZ, S.; SOHMEN, D.; DOENHOEFER, A.; WILSON, D. N. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. **Biological Chemistry**, Berlin, v. 395, p. 559-575. May 2014.

FAIR, R. J. TOR, Y. Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. **Perspectives in Medicinal Chemistry**, v.6, n. 1, p. 25-64. Abr 2014.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA) - 2012**. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/012/i0765pt/i0765pt09.pdf>> Acesso em: 12 de março de 2014.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. 2007. **Improving *Penaeus monodon* hatchery practices: Manual based on experience in India**. FAO Fisheries and Aquaculture Department: Rome. 101p.

FARMER III, J. J.; JANDA, J. M.; BRENNER, F. W.; CAMERON, D. N.; BIRKHEAD, K. M. Genus 1. *Vibrio* Pacini 1894, 411^{AL}. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2nd ed., v. 2. The Proteobacteria Part B: The Gammaproteobacteria. Brenner, D. J.; Krieg, N. R.; Staley, J. T. editors, 2005. P. 494-456.

FRIES, J. S.; CHARACKLIS, G. W.; NOBLE, R. T. Sediment-water exchange of *Vibrio* sp and fecal indicator bacteria: Implications for persistence and transport in the Neuse River Estuary, North Carolina, USA. **Water Research**, v. 42, n. 4-5, p. 941-950, Feb 2008.

FURUSHITA, M.; OKAMOTO, A; MAEDA, T.; OHTA, M.; SHIBA, T. Isolation of multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* from cultured yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) from a marine fish farm. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 71, n. 9, p. 5598-5600, Sep 2005.

GAUDREAU, C.; GIROUARD, Y.; GILBERT, H.; GAGNON, J.; BEKAL, S. Comparison of Disk Diffusion and Agar Dilution Methods for Erythromycin, Ciprofloxacin, and Tetracycline Susceptibility Testing of *Campylobacter coli* and for Tetracycline Susceptibility Testing of *Campylobacter jejuni* subsp *jejuni*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 52, n. 12, p. 4475-4477. Dec 2008.

GRAVE, K.; TORREN-EDO, J.; MULLER, A.; GREKO, C.; MOULIN, G.; MACKAY, D. Variations in the sales and sales patterns of veterinary antimicrobial agents in 25 European countries. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 69, n. 4, p.1-7. Apr 2014.

HAN, F.; WALKER, R. D.; JANES, M. E.; PRINYAWIWATKUL, W.; GE, B. Antimicrobial susceptibilities of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* isolates from Louisiana gulf and retail raw oysters. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 7096-7098. Nov 2007.

HASAN, B. M. A.; GUHA, B.; DATTA, S. Optimization of Feeding Efficiency for Cost Effective Production of *Penaeus monodon* Fabricius in Semi-Intensive Pond Culture System. **Journal of Aquaculture Research & Development**, v. 3, n. 6, p. 1-7, Dec 2012.

HATHA, M.; VIVEKANANDHAN, A. A.; JOICE, G. J.; CHRISTOL. Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 98, n. 2, p. 131-134, Feb 2005.

HEIJDEN, I. M.; LEVIN, A. S.; PEDRI, E. H.; FUNG, L.; ROSSI, F.; DUBOC, G.; BARONE, A. A.; COSTA, S. F. Comparison of disc diffusion, *Etest* and broth microdilution for testing susceptibility of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* to polymyxins. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 6, n. 8, p. 1-7. Jan 2007.

HU, G.-Z. *et al.* Prevalence of tetracycline resistance genes and identification of tet(M) in clinical isolates of *Escherichia coli* from sick ducks in China. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 851-858, Jun 2013.

HUANG, X.; LIU, C.; LI, K.; LIU, F.; LIAO, D.; LIU, L.; ZHU, G.; LIAO, J., Occurrence and distribution of veterinary antibiotics and tetracycline resistance genes in farmland soils around swine feedlots in Fujian Province, China. **Environmental Science and Pollution Research**, Heidelberg, v. 20, p. 9066-9074. Dec 2013.

HUQ, A. *et al.* Critical factors influencing the occurrence of *Vibrio cholerae* in the environment of Bangladesh. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 8, p. 4645-4654, Aug 2005.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção de pescado marítimo e continental no Brasil em 2014**. Disponível em: <<http://seriesestatisticas.ibge.gov.br/series.aspx?vcodigo=IU17&t=producao-pescado-maritima-continental>> Acesso em: 05 de janeiro de 2016.

KANNAPIRAN, E.; RAVINDRAN, J.; CHANDRASEKAR, R.; KALAIARASI, A., Studies on luminous, *Vibrio harveyi* associated with shrimp culture system rearing *Penaeus monodon*. **Journal of Environmental Biology**, Vikas Nagar, v. 30, n. 5, p. 791-795. Sep 2009.

KEEN, E. F. *et al.* Evaluation of Potential Environmental Contamination Sources for the Presence of Multidrug-Resistant Bacteria Linked to Wound Infections in Combat Casualties. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 33, n. 9, p. 905-911, Sep 2012.

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

KESARCODI-WATSON, A.; KASPAR, H.; LATEGAN, M. J.; GIBSON, L. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 274, p. 1-14. Jan 2008.

KIM, S. R.; NONAKA, L.; SUZUKI, S., Occurrence of tetracycline resistance genes tet(M) and tet(S) in bacteria from marine aquaculture sites. **Fems Microbiology Letters**, v. 237, p. 147-156. 2004.

KIM, S.; YUN, Z.; HA, U.-H.; LEE, S.; PARK, H.; KWON, E. E.; CHO, Y.; CHOUNG, S.; OH, J.; MEDRIANO, C. A.; CHANDRAN, K., Transfer of antibiotic resistance plasmids in pure and activated sludge cultures in the presence of environmentally representative micro-contaminant concentrations. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 468, p. 813-820. Jan 2014.

KIMES, N. E.; GRIM, C. J.; JOHNSON, W. R.; HASAN, N. A.; TALL, B. D.; KOTHARY, M. H.; KISS, H.; MUNK, A. C.; TAPIA, R.; GREEN, L.; DETTER, C.; BRUCE, D. C.; BRETTIN, T. S.; COLWELL, R. R.; MORRIS, P. J. Temperature regulation of virulence factors in the pathogen *Vibrio coralliilyticus*. **Isme Journal**, New York, v. 6, n. 835-846. Apr 2012.

KITAOKA, M. *et al.* Antibiotic resistance mechanisms of *Vibrio cholerae*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 397-407, Apr 2011.

- KITIYODOM, S. *et al.* Characterization of antibiotic resistance in *Vibrio* spp. isolated from farmed marine shrimps (*Penaeus monodon*). **Fems Microbiology Ecology**, 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. 2008.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA. B. **Diagnóstico microbiológico – texto e atlas colorido**. 5.ed. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, 2001. 1465p.
- KOONSE, B.; BURKHARDT, W.; CHIRTEL, S.; HOSKIN, G. P. (2005). *Salmonella* and sanitary quality of aquacultured shrimp. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 2527–2532. Jan 2005.
- KUMAR, K. *et al.* Antibiotic use in agriculture and its impact on the terrestrial environment. **Advances in Agronomy**, v. 87, p. 1-54, 2005.
- KUMAR, K.; GUPTA, S. C.; CHANDER, Y.; SINGH, A. K. Antibiotic use in agriculture and its impact on the terrestrial environment. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 87, p. 1–54. Jan 2005.
- KÜMMERER, K. Significance of antibiotics in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 52, n. 2, p. 317-322, Aug 2003.
- LABREUCHE, Y.; PALLANDRE, L.; ANSQUER, D.; HERLIN, J.; WAPOTRO, B.; LE ROUX, F. Pathotyping of *Vibrio* Isolates by Multiplex PCR Reveals a Risk of Virulent Strain Spreading in New Caledonian Shrimp Farms. **Microbial Ecology**, New York, v. 63, p. 127-138. Jan 2012.
- LAFFERTY, K. D. *et al.* Infectious Diseases Affect Marine Fisheries and Aquaculture Economics. **Annual Review of Marine Science**, Vol 7, v. 7, p. 471-496, 2015 2015.
- LARSEN, M. H.; BLACKBURN, N.; LARSEN, J. L.; OLSEN, J. E. Influences of temperature, salinity and starvation on the motility and chemotactic response of *Vibrio anguillarum*. **Microbiology-Sgm**, Reading, v. 150, p. 1283-1290. May 2004.
- LI, W. *et al.* Mechanism of tetracycline resistance by ribosomal protection protein Tet(O). **Nature Communications**, v. 4, Feb 2013.
- LIGHTNER, D.V. Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. **Journal of World Aquaculture Society**, v. 36, p. 229–248. 2005.
- LIGHTNER, D.V.; REDMAN, R.M. An epizootic of necrotizing hepatopancreatitis in cultured penaeid shrimp (Crustacea: Decapoda) in northwestern Peru. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 122, p. 9–18. 1994.
- LIU, P. C., LEE, K. K., CHEN, S. N. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in Tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 22, n. 6, p. 413-416, June 1996.

- LIU, P. C., LEE, K. K., CHEN, S. N. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in Tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 22, n. 6, p. 413-416, June 1996.
- LOBOVA, T. I.; BARKHATOV, Y. V.; SALAMATINA, O. G. V.; POPOVA, L. Y. Multiple antibiotic resistance of heterotrophic bacteria in the littoral zone of Lake Shira as an indicator of human impact on the ecosystem. **Microbiological Research**, Jena, v. 163, p. 152-160. 2008.
- MARON, D. F.; SMITH, T. J. S.; NACHMAN, K. Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. **Globalization and Health**, London, v. 9, n. 48, p. 1-11. Oct 2013.
- MARTINEZ, J. L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 11, p. 2893-2902, Nov 2009.
- 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**, v. 42, n. 4, p. 1463-1469, Oct-Dec 2011
- MICHALOVA, E.; NOVOTNA, P.; SCHLEGLOVA, J. Tetracyclines in veterinary medicine and bacterial resistance to them. **Veterinarni Medicina**, v. 49, n. 3, p. 79-100, Mar 2004.
- MOHANTY, R. K. Feeding management and waste production in semi-intensive farming of *Penaeus monodon* (fab.) at different stocking densities. **Aquaculture International**, v. 9, n. 1, p. 345-355, Nov 2001.
- MOLINA-AJA, A. *et al.* Plasmid profiling and antibiotic resistance of *Vibrio* strains isolated from cultured penaeid shrimp. **Fems Microbiology Letters**, v. 213, n. 1, p. 7-12, Jul 16 2002.
- NEELA, F. A.; NONAKA, L.; SUZUKI. The Diversity of Multi-drug Resistance Profiles in Tetracycline-Resistant *Vibrio* Species Isolated from Coastal Sediments and Seawater. **The Journal of Microbiology**, Tóquio, v. 45, n. 1, p. 64-68. Feb 2007.
- NIKAIDO, H. Multidrug resistance in bacteria. **Annual Review in Biochemistry**, Palo Alto, v. 78, n. 1, p. 119-146, Jan 2009.
- NIKOLAKOPOULOU, T. *et al.* PCR detection of oxytetracycline resistance genes otr(A) and otr(B) in tetracycline-resistant streptomycete isolates from diverse habitats. **Current Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 211-216, Oct 2005.
- NOGUEROLA, I.; BLANCH, A. R. Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomous keys. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 105, n. 1, p. 175-185, July 2008.
- NONAKA, L., IKENO, K. AND SUZUKI, S. Distribution of tetracycline resistance gene, tet(M), in Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from sediment and seawater at a coastal aquaculture site in Japan. **Microbes in Environment**, v. 22, p. 355-364. Jul 2007.
- NORIEGA-OROZCO, L. *et al.* Pathogenic and non pathogenic *Vibrio* species in aquaculture shrimp ponds. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v. 49, n. 3-4, p. 60-67, 2007.

NUNES, A. J. P. MADRI, R. M.; ANDRADE, T. P. Carcinicultura marinha no Brasil: passado, presente e futuro. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 8, n.124, p.32-34. Jan 2011.

PAGES J.M. Bacterial porin and antibiotic susceptibility. **Medical Science**, Paris, v. 20, n. 3, p. 346–351, Mar 2004.

PAIVA-MAIA, E.; ALVES-MODESTO, G. A.; OTAVIO-BRITO, L.; OLIVEIRA, A.; VASCONCELOS-GESTEIRA, T. C. Effect of a commercial probiotic on bacterial and phytoplankton concentration in intensive shrimp farming (*Litopenaeus vannamei*) recirculation systems. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 41, n. 1. p. 126-137. Jan 2013.

PARVATHI, A.; MENDEZ, D.; ANTO, C. Distribution of Putative Virulence Genes and Antimicrobial Drug Resistance in *Vibrio* harveyi. **Indian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 332-337, Jul 2011.

PAUNGFOO, C.; PRASERTSAN, P.; BURRELL, P. C.; INTRASUNGKHA, N.; BLACKALL, L. L. Nitrifying Bacterial Communities in an Aquaculture Wastewater Treatment System Using Fluorescence in Situ Hybridization (FISH), 16s rRNA Gene Cloning, and Phylogenetic Analysis. **Biotechnology and Bioenergetic**, Amsterdam, v. 97, n. 4, p. 985–990. Feb 2007.

PHAM, D. *et al.* Selection and characterization of potential probiotic bacteria for *Litopenaeus stylirostris* shrimp hatcheries in New Caledonia. **Aquaculture**, v. 432, p. 475-482, Aug 20 2014.

PINTO, A.; TERIO, V.; NOVELLO, L.; TANTILLO, G. Comparison between thiosulphate-citrate-bile salt sucrose (TCBS) agar and CHROMagar *Vibrio* for isolating *Vibrio parahaemolyticus*. **Food Control**, Oxford, v. 22, p. 124-127. Jan 2011.

PRAKASH, V.; LEWIS, J. S., II; JORGENSEN, J. H. Vancomycin MICs for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates Differ Based upon the Susceptibility Test Method Used. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 52, n. 12, p. 4528-4528. Dec 2008.

RAISSY, M. *et al.* Antibiotic resistance pattern of some *Vibrio* strains isolated from seafood. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, v. 11, n. 3, p. 618-626, Jul 2012.

RAJA, R. A. *et al.* Effect of Season and Treatment of Seed with Antibiotics on Grow out Culture of Tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) at Sunderban, India. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 14, n. 4, p. 879-885, Dec 2014.

RAO, M. B.; SURENDRAM, P. K. Pathogenic *Vibrios* in *Penaeus monodon* Shrimp Hatcheries and Aquaculture Farms. **Fishery Technology**, v. 50, n. 2, p. 23-27, Nov 2013.

READY, D. *et al.* Potential role of *Veillonella* spp. as a reservoir of transferable tetracycline resistance in the oral cavity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 8, p. 2866-2868, Aug 2006.

REBOUÇAS, R. H.; SOUSA, O. V.; LIMA, A. S.; VASCONCELOS, F. R.; CARVALHO, P. B.; VIEIRA, R. H. S. F. 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.

ROBERTS, M. C. Update on acquired tetracycline resistance genes. **Fems Microbiology Letters**, v. 245, n. 2, p. 195-203, Apr 15 2005.

ROCHA, A. M. N.; LOPES, F. D.; BORGES, D. F. A inclusão da construção do Centro tecnológico do camarão - RN. **Revista Eletrônica de Gestão Organizacional**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 375-388. Set/Dez 2009.

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.** 84 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca), Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

SAMBROOK, J., FRITSCHI, E.F.; MANIATIS, T. 1989. **Molecular cloning: a laboratory manual**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

SCHULTSZ, C.; GEERLINGS, S. Plasmid-Mediated Resistance in Enterobacteriaceae Changing Landscape and Implications for Therapy. **Drugs**, v. 72, n. 1, p. 1-16, 2012.

SEYFRIED, E. E.; NEWTON, R. J.; RUBERT, K. F.; PEDERSEN, J. A.; MCMAHON, K. D. Occurrence of Tetracycline Resistance Genes in Aquaculture Facilities with Varying Use of Oxytetracycline. **Microbial Ecology**, v. 59, p. 799-807. 2010.

SHAW, K. S.; GOLDSTEIN, R. E. R.; HE, X.; JACOBS, J. M.; CRUMP, B. C.; SAPKOTA, A. R. Antimicrobial Susceptibility of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* Recovered from Recreational and Commercial Areas of Chesapeake Bay and Maryland Coastal Bays. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 2, p. 1-11, Feb 2014.

SHINODA, S.; NAKAGAWA, T.; SHI, L.; BI, K.; KANO, Y.; TOMOCHIKA, K.; MIYOSHI, S.; SHIMADA, T. Distribution of virulence-associated genes in *Vibrio mimicus* isolates from clinical and environmental origins. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 48, n. 7, p. 547-551, July 2004.

SILVA, C. M. *et al.* Population dynamics and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp. along a salinity gradient in an urban estuary in Northeastern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 89, n. 1-2, p. 96-101, Dec 15 2014.

SINGH, V.; BALA, M.; KAKRAN, M.; RAMESH, V. Comparative assessment of CDS, CLSI disc diffusion and *Etest* techniques for antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae*: a 6-year study. **Bmj Open**, London, v. 2, n. 4, p. 1-9. 2012.

SONIA, G. A. S.; LIPTON, A. P. Pathogenicity and antibiotic susceptibility of *Vibrio* species isolated from captive-reared tropical marine ornamental blue damselfish, *Pomacentrus caeruleus* (Quoy and Gaimard, 1825). **Indian Journal of Geo-marine sciences**, Mumbai, v. 41, n. 4, p. 358-364. Aug 2012.

SOTO-RODRIGUEZ, S. A.; GOMEZ-GIL, B.; LOZANO, R.; DEL RIO-RODRIGUEZ, R.; DIEGUEZ, A. L.; ROMALDE, J. L. Virulence of *Vibrio harveyi* responsible for the "Bright-red" Syndrome in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 109, n 3, p. 307-317. Mar 2012.

SOUSA, O. V. *et al.* The impact of shrimp farming effluent on bacterial communities in mangrove waters, Ceara, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, n. 12, p. 1725-1734, 2006.

SPEER, B. S.; SHOEMAKER, N. B.; SALYERS, A. A. BACTERIAL-RESISTANCE TO TETRACYCLINE - MECHANISMS, TRANSFER, AND CLINICAL-SIGNIFICANCE. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, n. 4, p. 387-399, Oct 1992.

SRINIVASAN, V. *et al.* Distribution of tetracycline and streptomycin resistance genes and class 1 integrons in Enterobacteriaceae isolated from dairy and nondairy farm soils. **Microbial Ecology**, v. 55, n. 2, p. 184-193, Feb 2008.

SUNDARAMANICKAM, A. *et al.* Isolation and molecular characterization of multidrug-resistant halophilic bacteria from shrimp farm effluents of Parangipettai coastal waters. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 15, p. 11700-11707, Aug 2015.

SUZUKI, S.; HON, P. T. P. Distribution of quinolones, sulfonamides, tetracyclines in aquatic environment and antibiotic resistance in Indochina. **Frontiers in Microbiology**, Amsterdam, v. 3, n. 67, p. 1-8. Feb 2012.

SVARA, F.; RANKIN, D. J. The evolution of plasmid-carried antibiotic resistance. **Bmc Evolutionary Biology**, v. 11, May 19 2011.

SWAPNA, K. M.; RAJESH, R.; LAKSHMANAN, P. T. Incidence of antibiotic residues in farmed shrimps from the southern states of India. **Indian Journal of Geo-marine sciences**, Mumbai, v. 41, n. 4, p. 344-347. Aug 2012.

TAKEMURA, A. E.; CHIEN, D. M.; POLZ, M. E. Associations and dynamics of *Vibrionaceae* in the environment, from the genus to the population level. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, Feb 11 2014.

TAMMINEN, M. *et al.* Tetracycline Resistance Genes Persist at Aquaculture Farms in the Absence of Selection Pressure. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 2, p. 386-391, Jan 2011.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos** – 3ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2001. 1122p.

TENDENCIA, E. A.; DE LA PEÑA, L. D. Level and percentage recovery of resistance to oxtetracycline and oxolinic acid of bacteria from shrimp ponds. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 213, n.1-4, p. 1-13, Oct 2002.

TENORIO, G. S. *et al.* Mangrove shrimp farm mapping and productivity on the Brazilian Amazon coast: Environmental and economic reasons for coastal conservation. **Ocean & Coastal Management**, v. 104, p. 65-77, Feb 2015.

- THOMPSON, J. R.; RANDA, M. A.; MARCELINO, L. A.; TOMITA-MITCHELL, A.; LIM, E.; POLZ, M. F. Diversity and dynamics of a north Atlantic coastal *Vibrio* community. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 4103-4110. Jul 2004.
- TORTORA; G. J.; FUNKE; B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894p.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4ª ed - Revisada e atualizada. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. 718 p.
- VAN BOECKEL, T. P. *et al.* Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 18, p. 5649-5654, May 2015.
- VANBROEKHOVEN, K. *et al.* Acinetobacter diversity in environmental samples assessed by 16S rRNA gene PCR-DGGE fingerprinting. **Fems Microbiology Ecology**, v. 50, n. 1, p. 37-50, Oct 1 2004.
- VASANTHAKUMARI, R. **Practical Microbiology**. Mumbai: BI Publications. 2009. 105p.
- VIEIRA, R. H. S. F.; ROCHA, R. S.; CARVALHO, E. M. R.; SOUSA, O. V.; GESTEIRA, T. C. V. *Vibrio* na água e sedimento de viveiros de quatro fazendas de carcinicultura no estado do Ceará, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.47, n. 7, p. 54-62. Jan 2010.
- VIEIRA, R. H. S. F.; SOUSA, O. V.; COSTA, R. A.; TEOFILO, G. N. D.; MACRAE, A.; FONTELES FILHO, A. A.; RODRIGUES, D. P. Raw oysters can be a risk for infections. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 14, n. 1, p. 66-70, Jan 2010.
- WILLIAMS, R. R.; LIGHTNER, D. V. Regulatory status of therapeutants for penaeid shrimp culture in the United States. **Journal of World Aquaculture Society**, v. 19, p. 188-196. 1988.
- WIUFF, C. *et al.* Phenotypic tolerance: Antibiotic enrichment of noninherited resistance in bacterial populations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1483-1494, Apr 2005.
- WU, N.; QIAO, M. Tetracycline Residues and Tetracycline Resistance Gene Pollution in Soil: A Review. **Asian Journal of Ecotoxicology**, v. 5, n. 5, p. 618-627, Oct 2010.
- YAGOUB, S. A. Isolation of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. from raw fish sold in fish market in Khartoum state. **Journal of Bacteriology Research**, v. 17, p. 85-88, Oct 2009.
- 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**, v. 110, n. 3, p. 713-722, Mar 2011.
- YINGKAJORN, M. *et al.* Prevalence and quantification of pathogenic *Vibrio* parahaemolyticus during shrimp culture in Thailand. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 112, n. 2, p. 103-111, Dec 2 2014.

YUMOTO, I.; IWATA, H.; SAWABE, T.; UENO, K.; ICHISE, N.; MATSUYAMA, H.; OKUYAMA, H.; KAWASAKI, K. Characterization of a facultatively psychrophilic bacterium, *Vibrio rumoiensis* sp. nov., that exhibits high catalase activity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 67-72. Jan 1999.

ZAREI, M. *et al.* Chitinase isolated from water and soil bacteria in shrimp farming ponds. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, v. 11, n. 4, p. 911-925, Oct 2012.

ZHANG, H. *et al.* Production of chitin from shrimp shell powders using *Serratia marcescens* B742 and *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 successive two-step fermentation. **Carbohydrate Research**, v. 362, p. 13-20, Nov 15 2012.

ZHANG, T. *et al.* Tetracycline Resistance Genes and Tetracycline Resistant Lactose-Fermenting Enterobacteriaceae in Activated Sludge of Sewage Treatment Plants. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 10, p. 3455-3460, May 15 2009.