

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DA ÁGUA DE VIVEIROS DE CAMARÃO

FÁBIO L. SOARES JÚNIOR¹; FERNANDO D. ANDREOTE²; JOÃO L. DA SILVA³; JÚLIO F. DE QUEIROZ⁴; ITAMAR S. DE MELO⁵

Nº 0803109

RESUMO

A carcinicultura é uma atividade comercial crescente em diversos países tropicais. No Brasil, esta atividade tem se intensificado no litoral do NE. Existem diversas técnicas para a criação de camarão, porém muitas dessas têm causado impactos ambientais nos ecossistemas próximos às fazendas de criação, como exemplo em áreas de manguezal. O presente trabalho tem por finalidade o isolamento e avaliação da resistência de bactérias presentes na água de cultivo de camarão, avaliadas em seis pontos ao longo de um viveiro de criação. A comunidade bacteriana variou em sua densidade entre os pontos amostrados, sendo que dentro do viveiro a densidade bacteriana foi menor. No teste de resistência aos antibióticos, o crescimento de alguns isolados na presença de antibióticos evidenciou que existem populações naturalmente resistentes, que podem sofrer pressão de seleção, gerando um impacto ambiental causado pela aplicação de antibióticos. Os resultados obtidos indicaram que podem ocorrer impactos ambientais em decorrência do uso de antibióticos para controle de doenças de camarão, tornando essa metodologia de grande importância e utilidade para estudos de avaliação e monitoramento de impacto ambiental.

ABSTRACT

The shrimp farming is a developing commercial activity in tropical countries. In Brazil, this activity has been intensified in the littoral area. A number of techniques are available for the

¹ Orientando: Graduação em Ciências Biológicas, PUCCAMP, Campinas-SP, ✉ fabio_biologia@hotmail.com

² Colaborador: Pós-doutorando, LMA/ Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

³ Colaborador: Técnico, LMA/ Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

⁴ Co-orientador: Pesquisador, LEA/ Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

⁵ Orientador: Pesquisador, LMA/ Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

cultivation of shrimps, however, mostly of them has caused environmental impact in the near ecosystems like the mangroves area. This work aimed to isolate bacteria and to evaluate the resistance against antibiotics, in six sampling points along a reservoir used for shrimp cultivation. Bacterial community revealed to be variable in sampled points, where inside the reservoir less bacteria could be cultivated. Concerning the antibiotic resistance, the growing of some strains in the presence of antibiotics indicate that existence of naturally resistant populations, who can be targeted by the selection pressure, generating an environmental impact caused by the application of antibiotics. On that way, alternative methodologies for controlling shrimp diseases became highly important for application in the productive areas.

INTRODUÇÃO

Com 8.400 km de costa, clima favorável e terras disponíveis, o Brasil tem um grande potencial para o desenvolvimento da carcinicultura, atividade já praticada em algumas regiões desde o início nos anos 90, principalmente nos Estados do Ceará, Rio Grande do Norte e Pernambuco (ROCHA, 2007).

Nestas áreas, o cultivo de camarão é uma atividade de grande importância como alternativa na pesca artesanal e industrial (SILVA *et al.*, 2003), além disso, o camarão um dos produtos de maior valor agregado no setor pesqueiro mundial, onde apresenta uma demanda de aproximadamente 3,5 milhões de toneladas anuais. A carcinicultura é uma das atividades comerciais que mais crescem no Nordeste brasileiro, responsável por 90% da produção de camarão do Brasil, com isso o número de fazendas de camarão nesta região recrudescceu de 20, em 1985, para 905 em 2003 (De OLIVEIRA, 2006).

A falta de métodos eficazes para prevenir e reduzir os impactos socioeconômicos e ambientais, e o aumento de leis de proteção ambiental muito restritivas, representam um impedimento considerável para o desenvolvimento da carcinicultura brasileira (BOYD *et al.*, 2003). Diante disso, a adoção de Boas Práticas de Manejo (BPMs) é considerada como uma das alternativas mais efetivas para reduzir os impactos ambientais dessa atividade (HAIRSTON *et al.*, 1995).

A contaminação da água dos viveiros por bactérias causa um grande impacto nas áreas próximas as fazendas de criação de camarão (PEREIRA, 2003), o quadro de doenças

infeciosas de camarões no Brasil é praticamente desconhecido (BUENO, 1989 *apud* PAVANELLI *et al.*, 2000). A utilização de antibióticos para controle de doenças nos cultivos pode levar ao aumento na população bacteriana existente neste ambiente, por aumentar a pressão de seleção (COHEN, 1992).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi detectar a ocorrência natural de bactérias resistentes à antibióticos em diversas amostras de água coletadas em uma fazenda de produção de camarão localizada no litoral sul do Estado de Pernambuco. Uma vez que estas populações ocorrem de forma natural, mesmo que em baixa densidade, elas podem ser alvos de atuação da pressão de seleção exercida pela aplicação dos antibióticos, o que causaria alterações nas comunidades bacterianas naturais dos viveiros de camarão e das áreas de manguezais adjacentes.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de água foram coletadas em uma fazenda de cultivo de camarão localizada a 60 km ao sul da cidade de Recife-PE e transportadas para o Laboratório de Microbiologia Ambiental (LMA) da Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna, SP), onde foi realizado o isolamento e posteriormente, avaliação da resistência das bactérias aos antibióticos. As amostras foram coletadas em 6 pontos distintos, distribuídos nos viveiros de cultivo de camarão, sendo o ponto 1 – canal de abastecimento de água (lado externo do viveiro), ponto 2 – entrada de água (lado interno do viveiro), ponto 3 – no centro do viveiro, ponto 4 – próximo a comporta de drenagem da água (lado interno do viveiro), ponto 5 – canal de drenagem da água (lado externo do viveiro), ponto 6 – área de apicum próxima ao manguezal.

Para o isolamento das bactérias, 1ml de água de cada amostra foi adicionado a 9 mL (1:10) de solução NaCl 0,85% esterilizada e homogeneizados. A partir das suspensões iniciais, diluições em série (10^{-1} a 10^{-5}) foram preparadas e semeadas em placas de Petri contendo o meio de cultura Nutriente Agar (NA). As culturas foram incubadas a 28°C por até 4 dias após o isolamento. O número de colônias obtidas foi determinado, e estas foram coletadas e purificadas pelo método de esgotamento por três vezes, para garantir a pureza dos isolados (KÜSTER & WILLIAMS, 1964).

Para avaliar a ocorrência de resistência dos isolados bacterianos foram utilizados os antibióticos: amicacina (AMI 30), ampicilina (AMP 10), cefalotina (CFL 30), cefazolina

30), cefotaxima (CTX 30), cefoxitina (CFO 30), clindamicina (CLI 2), ciprofloxacina (CIP 5), cloranfenicol (CLO 30), eritromicina (ERI 15), gentamicina (GEN 10), kanamicina (KAN 30), norfloxacina (NOR 10), oxacilina (OXA 1), Penicilina G (PEN 10), sulfazotrim (SUT 25), tetracilina (TET 30). Os testes foram realizados com discos de papel 0,25 pol, imersos em solução dos antibióticos. Estes discos foram colocados nas placas de cultivo contendo suspensões de células dos isolados avaliados.

Após este procedimento foi observada a formação de halos de inibição para cada antibiótico, evidenciando a susceptibilidade do isolado ao correspondente antibiótico. Estes halos foram medidos (em mm), para comparação da susceptibilidade e resistência dos isolados. O procedimento foi realizado em triplicata (três repetições) para cada isolado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados mostraram a presença de bactérias em todos os pontos coletados. No entanto a densidade de bactérias capazes de crescer nas condições aplicadas de isolamento variou de acordo com os pontos de amostragem (Figura 1). Nos pontos de coleta situados dentro dos viveiros, o número de bactérias obtidas foi menor. Alguns fatores ambientais variam muito nesse tipo ambiente, e podem ter contribuído para a observação de tais diferenças, dentre eles, destaca-se a disponibilidade de oxigênio em função da grande densidade de camarões e do acúmulo de matéria orgânica resultante da adição de ração.

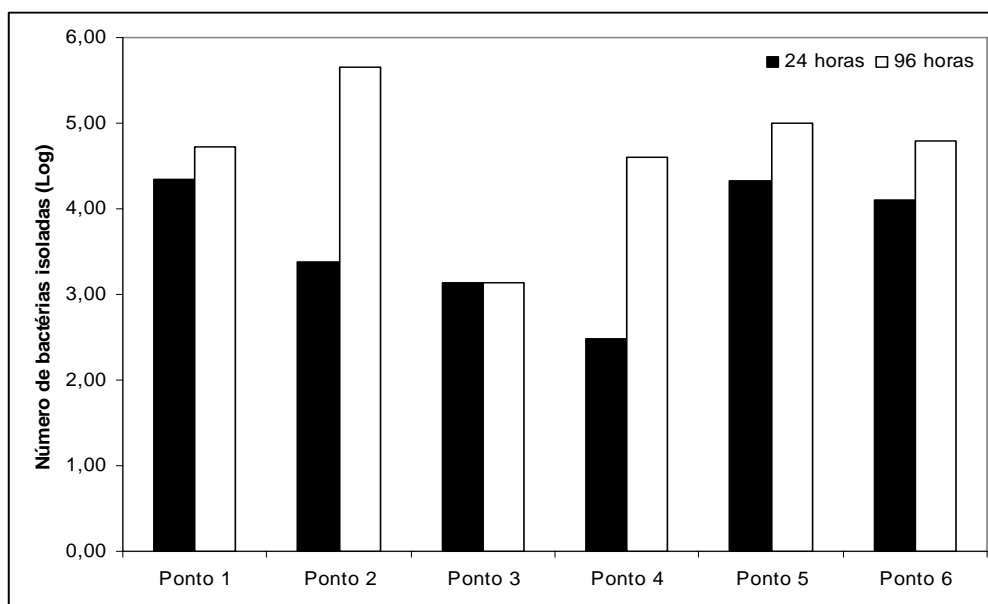


FIGURA 1. Variação do número de bactérias isoladas em dois períodos distintos (24 e 96 horas) em seis pontos de coleta em uma fazenda de produção de camarão do NE.

Dentre os isolados obtidos em água de cultivo de camarão, 12 foram selecionados (1% do total) com base nas diferenças morfológicas como, por exemplo, pigmentação e aspecto de crescimento, como representantes da comunidade total para avaliações de resistência aos antibióticos.

Os antibióticos testados foram capazes de inibir a maioria dos isolados avaliados (Tabela 1). Porém, foi possível observar a resistência de alguns isolados para diferentes antibióticos, o que demonstrou que as bactérias possuem a capacidade em acumular tais características em seu genoma. Por exemplo, os isolados mais resistentes foram os identificados pelos códigos 3AB3, 5AB1 e 5AB6, que mostraram resistência apenas para 3 dos 17 antibióticos testados. Entretanto os isolados identificados pelos códigos 1AB6, 1AB7 e 6AB5, não apresentaram nenhuma resistência aos antibióticos testados.

A presença dos genes de resistência na comunidade bacteriana residente neste sistema serve de base para a atuação da pressão de seleção, o que eleva a população dos genótipos resistentes, e aumenta a quantidade destes genes no ambiente, facilitando a ocorrência da transferência horizontal de genes dentre os membros desta comunidade. Dessa forma, a possível geração de genótipos multi-resistentes e super-resistentes é possibilitada. Considerando que o camarão é diretamente utilizado no consumo humano, esta hipótese torna-se mais evidente, mostrando a importância da utilização de métodos alternativos no controle de doenças.

TABELA 1. Tamanho de halos de inibição (em mm) observados para os diferentes isolados bacterianos submetidos aos efeitos de 17 antibióticos.

Antibióticos		Isolados avaliados											
testados		1AB6	1AB7	2AB3	2AB7	3AB2	3AB3	4AB2	4AB5	5AB1	5AB6	6AB1	6AB5
Não seletivos	GEN 10	9	20	5	9	6	3	9	5	6	4	8	10
	AMP 10	10	17	7	7	9	12	4	6	12	9	10	9
	CFL 30	15	13	15	10	11	9	20	12	5	4	15	13
	SUT 25	12	9	15	Res	18	2	12	15	Res	2	5	14
	CLO 30	10	12	Res	13	4	10	12	4	13	10	0	14
	TET 30	12	13	18	10	15	11	11	Res	11	6	14	16
	AMI 30	10	12	9	10	7	4	11	7	7	3	10	9
Gram -	CFO 30	11	15	5	8	7	9	10	6	10	6	16	11
	CIP 5	10	11	16	2	10	Res	13	9	9	5	9	11
	KAN 30	9	12	8	9	8	3	11	6	Res	3	10	12
	CTX 30	12	15	Res	9	Res	5	14	Res	Res	5	16	10
	CFZ 30	15	13	11	10	10	10	16	8	12	Res	15	16
Gram +	ERI 15	13	18	6	16	8	15	10	7	18	4	10	15
	CLI 2	9	20	5	13	5	4	1	5	7	Res	13	13
	NOR 10	11	22	10	4	10	Res	11	11	12	2	Res	12
	PEN 10	6	10	8	15	10	14	9	10	6	7	12	9
	OXA 1	5	8	3	3	5	Res	5	4	7	Res	Res	7

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que a comunidade bacteriana é afetada em sua densidade no ambiente de cultivo de camarões. Adicionalmente, observou-se a resistência de bactérias a diversos antibióticos nas amostras de água coletadas nos viveiros de camarão, o que evidencia a possibilidade de pressão de seleção nestas comunidades, levando ao desenvolvimento de bactérias super-resistentes. Este estudo sugere que métodos alternativos em substituição ao uso de antibióticos devem ser empregados no controle de doenças do camarão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOYD, C. E.; QUEIROZ, J. F. de; WHITIS, G. N.; HULCHER, R.; OAKES, P.; CARLISLE, J.; ODOM JR., D.; NELSON, M. M.; HEMSTREET, W.G. **Best management practices for**

channel catfish farming in Alabama. Montgomery, March 2003. 38 p. (Special Report nº1 For Alabama Catfish Producers).

COHEN, M.L. Epidemiology of drug resistanse: implications for a post antimicrobial era. **Science**, v.257, p.1050, 1992.

De OLIVEIRA, L.E.C. Carcinicultura: Panorama da Atividade e de seu Processo Licenciatorio. In: **I Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnologia**, Natal - RN, 2006.

HAIRSTON, J. E.; KOWN, S.; MEETZE, J.; NORTON, E.L.; DAKES, P.L.; PAYNE, V.; ROGERS, K.M. **Protecting water quality on Alabama farms.** Montgomery: Alabama Soil and Water Conservation Committee, 1995.

KÜSTER, E. & WILLIAMS, S.T. Selection of media for the isolation of streptomycetes. **Nature**. v.202, p.928-929, 1964.

LISBOA FILHO, W.; CARLINI JUNIOR, R.J. **A Carcinicultura na Região Nordeste: Uma Promissora Alternativa de Diversificação Econômica.** Caderno da FACECA, Campinas, v.13, n.1, p. 65-78, 2004.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M.; PAIVA, M. J. R. ; MAGALHÃES, A. R. M.. **Sanidade de peixes, rãs, crustáceos e moluscos.** In: Wagner Cotroni Valenti. (Org.). *Aqüicultura no Brasil - bases para um desenvolvimento sustentável.* 1 ed. Brasília: CNPq/ Ministério da Ciência e Tecnologia, 2000, v. 1, p. 197-245.

PEREIRA, A.M.L. **Relatório do Treinamento em Patologia de Camarões Marinhos,** realizados no Instituto Tecnológico de Sonora, Obregón - México. Parnaíba - PI, 2003.

ROCHA, I.P. Plano de Desenvolvimento da Aquicultura. **Revista ABCC**, Natal – RN, v.9, n.2, p.13, 2007.

SILVA, L.M.; GUIMARÃES, I.P.N.; MOURA, T.N.; JERONIMO, C.E.M.; MELO, H.N.S. Impactos Ocasionados pela Atividade da Carcinicultura Marinha no Ecossistema Manguezal no Brasil. In: **XXIX Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental**, 2003, Porto Rico: Asociacion Interamericana de Ingenieria Sanitária e Ambianta - AIDIS, 2003.