



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

LAUANA NATASHA DA GAMA PANTOJA

**IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS
ISOLADAS DO TRATO INTESTINAL DE ESPÉCIES DE
PEIXE DE INTERESSE COMERCIAL NO ESTADO DO
PARÁ**

Belém-PA

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

LAUANA NATASHA DA GAMA PANTOJA

**IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS
ISOLADAS DO TRATO INTESTINAL DE ESPÉCIES DE
PEIXE DE INTERESSE COMERCIAL NO ESTADO DO
PARÁ**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Manoel da Cruz Rodrigues.

Co-orientador: Prof. Dr. Hamilton Mendes Figueiredo

Belém-PA

2018

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

P198i Pantoja, Lauana Natasha da Gama.
IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS
ISOLADAS DO TRATO INTESTINAL DE ESPÉCIES DE
PEIXE DE INTERESSE COMERCIAL NO ESTADO DO PARÁ /
Lauana Natasha da Gama Pantoja. — 2018.
41 f.

Orientador(a): Prof. Dr. Antonio Manoel da Cruz Rodrigues
Coorientador(a): Prof. Dr. Hamilton Mendes de Figueiredo
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Belém, 2018.

1. pescado amazonico. 2. microbiota. 3. antibioticos. 4.
antimicrobiano. 5. patogenos. I. Título.

CDD 576.163



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

LAUANA NATASHA DA GAMA PANTOJA

**IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO TRATO
INTESTINAL DE ESPÉCIES DE PEIXE DE INTERESSE COMERCIAL NO
ESTADO DO PARÁ**

DATA DA AVALIAÇÃO: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Antonio Manoel da Cruz Rodrigues
(PPGCTA/ITEC/UFPA – Orientador)

Prof. Dr. Hamilton Mendes Figueiredo
(FEA/ITEC/UFPA Co-orientador)

Prof. Dr. Nelson Rosa Ferreira
(PPGCTA/ITEC/UFPA – Membro Interno)

Profa. Dra. Evelyn Ivana Trindade Damasceno
(IFPA/CASTANHAL – Membro Externo)

Profa. Dra. Lúcia de Fátima Henriques Lourenço
(PPGCTA/ITEC/UFPA – Membro Interno Suplente)

Prof. Dr. Prof. Dr. Camilo Barroso Teixeira
(IECOS/UFPA/BRAGANÇA – Membro Externo Suplente)

Belém-PA
2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir chegar até aqui e alcançar mais uma etapa importante em minha vida.

Aos meus pais, Isa Gama e Jorge Luciano, por abdicarem dos seus próprios sonhos para que eu pudesse viver os meus. Pelo incentivo e apoio incondicional, por se fazerem presente em minha vida e serem os melhores pais que um filho poderia ter. Tudo o que sou hoje é por causa de vocês. Meus irmãos Roger e Hadan, por completarem a minha felicidade e serem o melhor presente de Deus.

Ao meu companheiro de todas as horas, o amor da minha vida, Rafael Borges. Obrigada por me completar, por sempre me apoiar, me incentivar, por ser tudo o que eu preciso.

Aos meus avós, Raimundo Nonato e Maria Nilma, obrigada por tudo. Por não medirem esforços e me ajudarem sempre.

Ao meu tio Jorge Pantoja e minha querida Milene Pantoja, vocês são essenciais em minha vida. Meu espelho, os que me conduzem. E a minha afilhada Ana Beatriz, por ser essa explosão constante de felicidade na minha vida.

As minhas amigas: Halana, Karina, Bruna, Maíra, Carol, Samira e Priscilla por serem as irmãs que a vida me deu e dividir todos os momentos ao meu lado.

A todos meus companheiros de laboratório, em especial: Dayala, Robson, Wasley, Rafaela, Rebeca, Carina, Giselle, Marcio, Nakata e Paulo. Obrigada pela amizade, por dividir os momentos bons e ruins. Fizeram tudo isso valer muito a pena.

Ao meu coorientador Hamilton Figueiredo, por toda ajuda para que este trabalho fosse possível, por sempre acreditar em mim. Por ser luz em meu caminho. Gratidão eterna.

Ao meu orientador Antonio Manoel e a professora Luiza Meller, pelas oportunidades e confiança durante todos esses anos. Por sempre abrirem as portas e me conduzirem pelo melhor caminho.

Aos professores que aceitaram fazer parte da minha banca de defesa, por seus conhecimentos e orientações.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste mestrado.

‘Tudo se torna mais fácil quando se tem fé. Não uma fé oscilante, mas uma fé firme naquele que tudo pode e tudo nos concede’.

(Irmã Dulce)

RESUMO

A região Amazônica é composta por uma grande variedade de espécies de peixes, e sua flora bacteriana ainda é pouco conhecida. Há um grande interesse no estudo de bactérias que possam contribuir para as pesquisas que buscam alternativas para os antibióticos utilizados na aquicultura. Por isso este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de duas espécies de peixes amazônicos, detectar bactérias presentes no trato intestinal de peixes, avaliar sua atividade inibitória contra cepas de *Salmonella Typhimurium* e *Staphylococcus aureus*, caracterizar o seu perfil à suscetibilidade e a resistência das espécies bacterianas a antibióticos. Foram identificadas 33 bactérias, sendo que destas 51,28% foram Gram Positivas e 48,72% Gram negativas. Os microrganismos predominantemente encontrados na Pescada Gó e Pratiqueira foram: *Micrococcus* spp, *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus lentus*, *Serratia odorífera* 1. Dos 39 isolados bacterianos que foram identificadas, 14 apresentaram atividade antimicrobiana frente aos patógenos testados, correspondendo a 35,9% de ação inibitória. Os halos de inibição contra os microrganismos indicadores testados apresentaram variações de 6,10 - 8,30 mm frente *Salmonella Typhimurium* e 6,55 - 13,7 mm para *Staphylococcus aureus*. As bactérias gram positivas se mostraram mais sensíveis aos agentes patogênicos e aos antibióticos. Algumas bactérias demonstraram resistência e serão fontes de estudo para melhorar a eficiência dos antimicrobianos.

Palavras-chaves: *Mugil curema*, *Macrodon ancylodon*, microbiota intestinal, resistência.

ABSTRACT

The Amazon region is composed of a large variety of fish species, and its bacterial flora is still little known. There is study interest of bacteria that refer to alternatives to the antibiotics used in the food industry. Therefore, this work had as objective to evaluate the microbiological of two species of Amazonian fish, to detect bacteria naturally present in the intestinal tract of fish that is in antagonistic activity in relation to pathogens and characterizers of their profile the susceptibility and resistance of bacterial species to antibiotics. A total of 39 bacteria were identified, of which 51.28% were Gram positive and 48.72% Gram negative. The microorganisms predominantly found in *Gó* and *Pratiqueira* were: *Micrococcus* spp, *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus lentus*, *Serratia odorífera* 1. Of the 39 bacteria that were identified, 14 presented antimicrobial activity against pathogens tested, corresponding to 35.9% of inhibitory action. Inhibition halos against the indicator microorganisms tested showed variations of 6.10 - 8.30 mm versus *Salmonella Typhimurium* and 6.55 - 13.7 mm for *Staphylococcus aureus*. Gram positive bacteria are more sensitive to pathogens and antibiotics. Bacteria have shown resistance and are sources of study to improve the efficiency of antimicrobials.

Key-words: *Mugil curema*, *Macrodon ancylodon*, intestinal microbiota, resistance.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Número de isolados bacterianos do pescado identificados por espécie.....27

LISTA DE TABELA

TABELA 1. Valores médios da caracterização microbiológica do pescado.	25
TABELA 2. Identificação de bactérias Gram positivas isoladas de Pescada Gó.....	28
TABELA 3. Identificação de bactérias Gram positivas isoladas da Pratiqueira.....	29
TABELA 4. Identificação de bactérias Gram negativas isoladas da Pratiqueira	31
TABELA 5. Identificação de bactérias Gram negativas isoladas da Pescada Gó.....	31
TABELA 6. Diâmetro dos halos de inibição obtidos pelo método de disco-difusão para Pescada Gó (Mugil curema) e Pratiqueira (Macrodon ancylodon).....	33
TABELA 7. Diâmetro dos halos sensibilidade ou resistência a antibióticos das bactérias da Pescada Gó e Pratiqueira.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

(CIP) – Ciprofloxacina

(LNZ) – Linezolida

(GEN) – Gentamicina

(AMP) - Ampicilina

(OXA) - Oxacilina

(PEN) - Penicilina

(TET) - Tetracina

(CFO) - Cefoxitina

(AZI) - Azitromicina

(SUT) - Sulfazotrim

(VAN) - Vancomicina

(CLIN) - Clindamicina

(ERI) - Eritromicina

(CLO) - Cloranfenicol

(RIF) - Rifampicina

SUMÁRIO

1 OBJETIVOS	12
1.1 Geral	12
1.2 Específicos	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 O pescado e sua microbiota.....	13
2.1.1 <i>Mugil curema</i> (Pratigueira)	13
2.1.2 <i>Macrodon Ancylo don</i> (Pescada Gó)	15
2.3 Isolamento bacteriano.....	16
3.3 Atividade antimicrobiana de microrganismos e o uso de antibióticos.....	17
ARTIGO: Susceptibilidade e resistência das espécies bacterianas de <i>Mugil curema</i> e <i>Macrodon ancylo don</i> a antibióticos	19
RESUMO	19
1 INTRODUÇÃO	20
2 MATERIAIS E MÉTODOS	21
2.1 Coleta das amostras.....	21
2.2 Caracterização microbiológica.....	21
2.3 Isolamento Bacteriano: Microbiota intestinal.....	22
2. Identificação da estirpe bacteriana.....	22
2.5 Atividade antibacteriana frente a patógenos.....	23
2.6 Antibiograma das cepas.....	23
3 RESULTADOS	24
3.1 Caracterização microbiológica.....	24
3.2 Identificação da estirpe bacteriana.....	26
3.3 Atividade antibacteriana dos microrganismos isolados da Pescada Gó e Pratigueira.....	31
3.4 Suscetibilidade aos antibióticos.....	33
4 CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38

1 OBJETIVOS

1.1 Geral

Avaliar os isolados bacterianos de duas espécies de peixe de interesse comercial na cidade de Belém – PA e pesquisar a susceptibilidade antimicrobiana das estirpes isoladas.

1.2 Específicos

- Isolar e identificar as bactérias presentes no trato intestinal das espécies de peixe Pratinheira (*Mugil curema*) e Pescada Gó (*Macrodon ancylodon*);
- Avaliação da qualidade microbiológica dos peixes (aeróbios mesófilos, e psicotróficos e coliformes);
- Detectar bactérias presentes no trato intestinal de peixes que apresentam atividade inibitória em relação a agentes patogênicos: *Salmonella* Typhimurium e *Staphylococcus aureus*;
- Susceptibilidade e resistência dos isolados bacterianos a antibióticos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O pescado e sua microbiota

A microbiota do pescado reflete a água onde esses animais vivem. Tal como ocorre nas carnes de animais de abate, os tecidos internos de um peixe sadio são estéreis. A biota do peixe normalmente é encontrada em três lugares: na superfície externa, nas guelras e nos intestinos. Os peixes de água morna tendem a ter uma biota mais rica em bactérias mesófilas gram-positivas do que os peixes de água fria, os quais predominam as bactérias gram-negativas (JAY, 2005).

Os microrganismos presentes no pescado apresentam características peculiares e são influenciados pela natureza do ambiente aquático, onde a temperatura é um dos fatores seletivos. Em espécies de águas tropicais e subtropicais, os micro-organismos encontrados são predominantemente do tipo mesófilos Gram (+) como *Micrococcus* spp, *Bacillus* spp e *Corynebacterium* spp, enquanto que em peixes de águas temperadas predominam bactérias psicrotróficas, aeróbicas ou facultativas Gram (-) (LALITHA e SURENDRAN, 2006; PANTAZI et al., 2008).

O pescado pode ser contaminado com o mais amplo e variado grupo de microrganismos, bem como por resíduos de produtos químicos, através de águas contaminadas ou poluídas dos estuários e das bacias pesqueiras. O pescado vivo, por sua vez, apresenta contaminação bacteriana principalmente na pele, brânquias e escamas, passando aos demais tecidos após a morte do animal. Desta forma, a manipulação indevida e a não observância de medidas higiênicas durante o transporte, manuseio e conservação podem facilitar o desenvolvimento dos patógenos, presentes no próprio pescado ou provenientes do ambiente (FAO, 2005).

Em águas costeiras, a probabilidade de contaminação do peixe é maior do que em águas mais profundas. Nos peixes os microrganismos estão restritos apenas ao muco superficial, guelras e trato gastrintestinal, encontrando-se ausente no tecido muscular. Entretanto, com a morte, suas defesas naturais deixam de existir e a microbiota superficial começa a invadir o interior dos tecidos, acelerando o processo de deterioração (SILVEIRA, 2005). Como a decomposição do pescado é causada principalmente pelas bactérias, uma das maneiras de retardar essa decomposição é diminuir a temperatura até um nível em que as bactérias não se desenvolvam, ou multipliquem-se muito lentamente (JAY, 2005). Sendo assim, a manutenção da qualidade do pescado está ligada ao

trinômio: tempo, higiene e temperatura. O tempo é importante na rapidez com que se desencadeiam reações autolíticas e/ou microbianas, que estão relacionadas com o grau de higiene do barco, estrutura de processamento e dos manipuladores do pescado, aliados às baixas temperaturas que, se devidamente aplicadas, evitarão ou retardarão as reações que levam à sua degradação (VIEIRA e SAMPAIO, 2004)

2.1.1 *Mugil curema* (Pratigueira)

Segundo Menezes (1983) a família Mugilidae, cujos principais representantes são as tainhas (ou pratigueiras, também conhecidas como caícas, curema, parati) inclui espécies de peixes distribuídos em 17 gêneros e 80 espécies. Estes animais têm ampla distribuição, ocorrendo em águas tropicais e subtropicais de todo o mundo, principalmente na região costeira estuarina. Têm uma grande importância comercial nas regiões onde se encontram, constituindo assim uma parte importante da alimentação humana.

Os representantes dessa família apresentam corpo roliço, sendo que as duas nadadeiras dorsais estão bem separadas entre si, sendo a primeira formada por três a quatro raios espinhosos e a segunda apenas por raios moles. As nadadeiras pélvicas sub-abdominais possuem um espinho e cinco raios mole. Outra característica a ressaltar é a ausência de uma linha lateral, assim como os dentes diminutos ou ausentes; os rastros branquiais são relativamente longos. São espécies detritívoras, alimentando-se da camada superior do bento (SANTOS, 2004).

Como as espécies dessa família são bem parecidas, muitas vezes duas ou mais espécies são tratadas como uma só. Por isso, segundo Menezes (1983), é importante identificar corretamente as espécies. Para isso, são levados em consideração caracteres externos, como o padrão de colorido, o número de séries laterais de escamas, etc.

Segundo Santos (2004), as principais características morfológicas do mugilídeos são o corpo roliço e fusiforme, sem linha lateral, escamas ctenóides (algumas espécies, segundo Issac (2005), apresentam também escamas do tipo ciclóide, como é o caso da *Mugil curema*), cabeça plana na parte superior, focinho cônico e curto, contido 3,6 vezes na cabeça; a boca é subterminal, com abertura em forma de V; o olho é parcialmente coberto com uma membrana adiposa, os lábios são laminares, sendo o superior munido de dentes cônicos e diminutos; primeira nadadeira dorsal mais próxima do focinho que

da base caudal e com quatro espinhos; segunda dorsal curta e com 8 raios ramificados; nadadeira peitoral em posição elevada e com 14 raios ramificados; a anal, a caudal e a segunda dorsal espessas e totalmente escamadas; apresenta um sulco na região mediana do dorso, atrás da nadadeira dorsal e que se estende até a vertical da ponta dos espinhos; escamas ctenóides, em número de 45 na série principal ao longo do corpo e 20 séries ao redor do pedúnculo; a coloração é cinza-escuro uniforme ou pontuada, formando 3 a 5 séries longitudinais incipientes ao longo do corpo.

2.1.2 *Macrodon ancylodon* (Pescada Gó)

"Pescada-gó", *Macrodon ancylodon* é o único Sciaenidae presente nas regiões norte e nordeste do país e inclui duas espécies geneticamente diferentes embora morfologicamente indistinguíveis (Santos et al., 2006). Podem atingir cerca de 40 cm de comprimento, são carnívoros e os crustáceos decápodes e os peixes da família gobiidae são suas presas (Piorski et al., 2004). Esta espécie é altamente apreciada para consumo e é abundante durante todo o ano na região nordeste do Pará. Por estas razões, é uma espécie muito importante economicamente para a região (Espírito Santo et al., 2005, Oliveira 2005). Entre os meses de dezembro a abril e de junho a outubro ocorre a sua frequência de desova. Em virtude dessa frequência de desova, a oferta é favorecida em grande parte do ano estabelecendo um grande volume de captura e a procura desta espécie pelo consumidor é devido ao seu baixo valor comercial (SZPILMAN, 2000).

Por ser um peixe com uma ampla distribuição, diversas denominações vulgares são encontradas para *M. ancylodon* tais como: pescadinha-gó, pescada-gó e corvina de boca-mole na região Norte; e pescadinha, pescada-foguete e pescadinha-real na região Sudeste/Sul. Dados sobre estatística pesqueira marítima do Estado do Pará indicam que a pesca costeira da região Norte é de natureza eminentemente artesanal, perfazendo 88% de todas as atividades pesqueiras (MMA-IBAMA-CEPNOR-SECTAM, 2011). As espécies mais importantes não só pelo volume de captura, mas também pelo seu alto valor comercial, desta área, são: a pescada-amarela (*Cynoscion acoupa*), a serra (*Scomberomus brasiliensis*), a cavala (*Scomberomus cavalla*), o pargo (*Lutjanus purpureus*), a gurijuba (*Arius parkeri*), a pescada-gó (*Macrodon ancylodon*) e os tubarões (*Carcharrhinus sp.*).

Em relação à pesca da pescada-gó, este recurso é capturado principalmente pela pesca artesanal através de currais (cerco fixo) e redes de emalhar. Na pesca industrial esse

recurso é capturado pela frota camaroneira, compondo a fauna acompanhante (SANTANA, 2008).

2.2 Isolamento bacteriano

Isolamento consiste na obtenção de culturas puras que envolvem somente o organismo de interesse. Na fase do isolamento, ocorre a seleção de uma colônia através da observação da produção de determinado produto ou da morfologia da colônia (STANBURY, WHITAKER E HALL, 1995). O isolamento inicia com a escolha da fonte mais provável de conter o microrganismo desejado, podendo variar desde solo até águas, ar, lodo, alimentos ou órgãos. Características que um determinado organismo possui para se desenvolver em certo ambiente são usadas como fatores seletivos no processo de isolamento (PRESCOTT, HARLEY e KLEIN, 2002).

Para fazer o isolamento de um microrganismo, deve-se empregar o meio de cultivo mais adequado para o seu desenvolvimento. O meio de cultura é um material nutriente preparado em laboratório cuja utilização é importante para o crescimento, transporte e estocagem de microrganismos. No preparo do meio muitas vezes emprega-se o ambiente natural como modelo de composição, pois os requerimentos nutricionais dos microrganismos refletem o tipo de ambiente onde ele é encontrado (PRESCOTT, HARLEY e KLEIN, 2002).

Apesar de existir a possibilidade de utilizar microrganismos geneticamente modificados, ainda é possível encontrar uma grande variedade de novos microrganismos no meio ambiente, sendo que muitos podem ser até comercialmente interessantes. A primeira etapa para a utilização de um microrganismo de interesse industrial muitas vezes é a etapa de isolamento de uma colônia. Normalmente, as colônias de microrganismos se originam somente de uma célula ou esporo de microrganismo. Essas colônias apresentam características morfológicas diferentes, as quais permitem a distinção entre os microrganismos. No entanto, para conseguir uma visualização das colônias independentes no meio sólido, é necessário a distribuição uniforme das bactérias sobre a placa de Petri. (TORTORA et al., 2006)

2.3 Atividade antimicrobiana de microrganismos e o uso de antibióticos

O estudo de agentes antimicrobianos possui uma grande amplitude, sendo determinantes em vários setores do campo farmacêutico e cosmético. Outro ponto a ser elucidado é a utilização desse estudo como primeiro *screening* na descoberta da atividade farmacológica de novos agentes, sendo de extrema importância, principalmente em um país como o Brasil que oferece uma vasta biodiversidade. Desta forma, tais pesquisas podem contribuir consideravelmente no desenvolvimento do campo da saúde em nível mundial, encontrando substâncias mais eficazes e menos tóxicas na corrida contra a resistência e o surgimento de microrganismos patogênicos (Michelin et al., 2005; Lima et al., 2006a).

Com o surgimento de patógenos emergentes e o reaparecimento de patógenos ré emergentes antigos e o desenvolvimento de linhagens resistentes à antibióticos, tem crescido o interesse na pesquisa e seleção de linhagens que possam ser usados para combater infecções bacterianas (MCCOY E GILLILAND, 2007).

De um modo simplificado, as bacteriocinas podem ser definidas como pequenos peptídeos catiônicos, termoestáveis, ativos contra outros tipos de bactérias, sendo que a bactéria produtora possui um mecanismo específico que lhe confere imunidade a estas substâncias (COTTER; HILL; ROSS, 2005).

As bacteriocinas têm sido muito estudadas devido as suas aplicações como conservadores naturais nos alimentos (GÁLVEZ et al., 2008). A aplicação de bacteriocinas em alimentos tem tendência ser mais eficiente quando as cepas produtoras são isoladas do próprio produto em que se pretende utilizá-las (COTTER; HILL; ROSS, 2005; De MARTINIS et al., 2002).

O ambiente aquático é muito dinâmico, o que facilita a transferência de fatores de resistência e emergência de cepas resistentes que podem facilmente chegar aos seres humanos (CABELLO, 2006). A medicina humana e veterinária carrega consigo um dos grandes desafios que é tentar solucionar de maneira adequada as infecções bacterianas e fungicas que vem acometendo os indivíduos dessa área. Mesmo com o surgimento de novos antibióticos, essa resistência bacteriana de diferentes patógenos vem aumentando e esse fenômeno é observado em várias partes do mundo (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

As medidas de prevenção e o controle de enfermidades fazem com que haja um consumo abusivo de antibiótico, no que resulta em uma dificuldade em controlar e

eliminar patógenos, tornando as bactérias resistentes aos medicamentos (FIGUEIREDO & LEAL 2008).

Artigo em fase de revisão para ser submetido à International Journal of Food Microbiology
(Configurado conforme normas da revista)

Suscetibilidade e resistência de isolados bacterianos de *Mugil curema* e *Macrodon ancylodon* a antibióticos

RESUMO

A região Amazônica é composta por uma grande variedade de espécies de peixes, e sua flora bacteriana ainda é pouco conhecida. Há um grande interesse no estudo de bactérias que possam contribuir para as pesquisas que buscam alternativas para os antibióticos utilizados na aquicultura. Por isso este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de duas espécies de peixes amazônicos, detectar bactérias presentes no trato intestinal de peixes, avaliar sua atividade inibitória contra cepas de *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*, caracterizar o seu perfil à suscetibilidade e a resistência das espécies bacterianas a antibióticos. Foram identificadas 33 bactérias, sendo que destas 51,28% foram Gram Positivas e 48,72% Gram negativas. Os microrganismos predominantemente encontrados na Pescada Gó e Pratiqueira foram: *Micrococcus* spp, *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus lentus*, *Serratia odorifera* 1. Dos 39 isolados bacterianos que foram identificadas, 14 apresentaram atividade antimicrobiana frente aos patógenos testados, correspondendo a 35,9% de ação inibitória. Os halos de inibição contra os microrganismos indicadores testados apresentaram variações de 6,10 - 8,30 mm frente *Salmonella typhimurium* e 6,55 - 13,7 mm para *Staphylococcus aureus*. As bactérias gram positivas se mostraram mais sensíveis aos agentes patogênicos e aos antibióticos. Algumas bactérias demonstraram resistência e serão fontes de estudo para melhorar a eficiência dos antimicrobianos.

Palavras-chaves: *Mugil curema*, *Macrodon ancylodon*, microbiota intestinal, resistência.

1 INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal é uma parte essencial do sistema digestório de todos os animais. O fato de serem organismos vivos significa que os microrganismos têm necessidades nutricionais para sobrevivência dentro de seu habitat natural. A maioria das bactérias do trato intestinal obtém energia necessária para crescimento e reprodução através dos componentes da dieta (APAJALAHTI et al., 2004).

A microbiota natural do peixe é relativamente uniforme e varia de acordo com o habitat da espécie, profundidade e grau de contaminação das águas e maior ou menor proximidade da costa e, sobretudo, a temperatura. No entanto, as variações observadas são muito mais acentuadas em termos de predominância relativa do que em gêneros presentes no pescado (FELDHUSEN, 2000; MURATORI et al., 2004). Os ambientes aquáticos são os mais expostos à presença de patógenos, por se tratarem de locais visitados pelas mais diferentes espécies de animais e ainda por contarem com a possibilidade de transporte de muitos agentes etiológicos deixados no solo e levados durante as estações chuvosas. Devido a isso, animais aquáticos, em especial peixes representam a maior exposição aos microrganismos (BOIJINK et al., 2001). Essa variação na microbiota faz com que o desenvolvimento de bactérias em ambientes aquáticos possa levar a disseminação de genes de resistência (CABELLO, 2006). Essa resistência a diferentes antibióticos foi detectada em peixes marinhos e de água doce, causando preocupação tanto na medicina humana como veterinária, tendo em vista as doenças causadas em humanos e animais domésticos por bactérias multi-resistentes (BLACKBURN et al., 2010).

O uso frequente e indiscriminado de agentes terapêuticos tem contribuído de forma relevante para o surgimento da resistência à oxitetraciclina, amoxicilina, ampicilina, novobiocim e polimixin-B (SAAVEDRA et al., 2004; HATHA, 2005). Nesse contexto, Mantilla et al. (2008) mencionaram que a ingestão de alimentos contendo resíduos de fármacos antimicrobianos pode ocasionar resistência bacteriana aos antimicrobianos utilizados no tratamento de enfermidades infecciosas humanas. Além disso, os mecanismos da resistência bacteriana são complexos, variados e não completamente conhecidos (KONEMAN et al., 2006; PALERMO-NETO et al., 2005). No entanto, para compreender os mecanismos da resistência bacteriana é necessário

compreender a fisiologia das bactérias, o mecanismo de ação dos fármacos antimicrobianos e a biologia molecular dos agentes infecciosos (KONEMAN et al., 2006)

Bactérias que inevitavelmente desenvolvem resistência aos antimicrobianos em animais são compreendidas por patógenos, oportunistas e comensais. Os mesmos genes de resistência aos antimicrobianos e os mecanismos de transferência de genes podem ser encontrados na microbiota de animais e seres humanos (TEUBER, 2011). Para que um antimicrobiano iniba ou destrua uma bactéria, três condições devem ser preenchidas: a existência de um alvo, ter a capacidade de atingir o alvo e não pode ser inativado antes de atingi-lo (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Considerando a relevância que a atividade pesqueira industrial da região Amazônica brasileira tem no cenário mundial, este trabalho teve como objetivo identificar as bactérias presentes no trato intestinal de duas espécies de peixe amplamente comercializadas na cidade de Belém – PA e caracterizar o seu perfil à suscetibilidade e a resistência das espécies bacterianas a antibióticos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta das amostras

Foram coletadas um total de 30 amostras de duas espécies de peixes, Pratineteira (*Mugil curema*) e Pescada Gó (*Macrodon ancylodon*). Para este estudo foram utilizadas 15 amostras de cada espécie. As coletas foram realizadas entre os meses de maio a agosto, sendo adquiridos 10 peixes por coleta (5 de cada espécie). Todas as amostras coletadas foram acondicionadas em saco estéreis e mantidas sob refrigeração a 5°C para posterior análises.

2.2 Qualidade microbiológica das amostras

A avaliação da qualidade microbiológica do pescado foi realizada segundo Downes e Ito (2001) descritas no *Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods*. Para esta análise, 25 g de cada amostra de peixe (parte ventral do

filé) foram retirados assepticamente para cada período de coleta. As amostras foram transferidas para sacos estéreis, e foram adicionados 225 ml de água de peptonada salina estéril. As amostras foram então homogeneizadas a 2.300 rpm por 30 s (Stomacher 400 Circulator SEWARD). As contagens totais de bactérias aeróbicas mesófilas e aeróbicas psicrófilas foram determinadas pela técnica de profundidade em ágar para contagem padrão (PCA), seguido por incubação a 36°C durante 48 h e 7°C durante 10 dias. Complementando a avaliação da qualidade microbiológica do pescado foi realizado também análise de coliformes totais a 45°C.

2.3 Isolamento Bacteriano

O isolamento da microbiota intestinal foi realizado utilizando *swab* estéril para coletar os microrganismos. O material coletado foi homogeneizado em 10 mL de água salina peptonada 0,1%. Sendo posteriormente inoculadas alíquotas de 0,1 mL sobre a superfície dos meios Violet Red Bile Glucose (VRBG) para estirpes de enterobactérias e agar Baird-Parker para bactérias gram positivas, ambos foram incubados a 18°C por 10 dias. A temperatura de 18°C foi utilizada para selecionar os indivíduos que apresentaram crescimento próximo da faixa de temperatura em que o pescado é comercializado. Após essa etapa foi feita a seleção de uma placa para cada meio, onde cinco a dez colônias por placas foram escolhidas aleatoriamente. As colônias selecionadas foram posteriormente estriadas no mesmo meio (VRBG ou Baird-Parker Agar) até obter um isolamento de cultura pura. As culturas puras foram incubadas a 36°C durante 48 h e posteriormente as colônias foram transferidas para tubos contendo caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) suplementados com 30% de glicerol e armazenados congelados para posterior etapa de identificação.

2.4 Identificação da estirpe bacteriana

Nesta etapa foi realizado previamente o teste de coloração de gram, para que os isolados bacterianos fossem identificados e classificados entre gram positivos e gram negativos. Após essa etapa os isolados bacterianos gram negativos foram identificadas utilizando o kit API 20E, enquanto as gram positivas foram identificadas pelo o kit API

Staph. O procedimento foi realizado conforme as recomendações feitas pelo fabricante (BioMerieux).

2.5 Teste da atividade antimicrobiana

O teste da atividade antimicrobiana foi realizado conforme a metodologia recomendado pela Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015). Para este teste foi utilizada uma suspensão de células padronizadas dos microrganismos-teste na concentração aproximada de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL. Essa padronização foi efetuada por meio de análise espectrofotométrica a 600nm para confirmação da concentração de microrganismos. Os microrganismos-teste utilizados neste ensaio foram cepas padrão ATCC (American Type Culture Collection) procedentes do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Após padronização, as linhagens bacterianas isoladas foram semeadas, em superfície, em placas contendo ágar Muller Hilton com a utilização de *swab*, de forma a permitir que toda a superfície apresentasse microrganismos. Posteriormente discos de papel filtro de 6 mm de diâmetro, previamente impregnados com os isolados bacterianos do pescado, e foram aplicados sobre as placas contendo os microrganismos-teste. Cada teste foi realizado em duplicata com três repetições para cada linhagem bacteriana isolada. A interpretação dos resultados foi realizada após 24h de incubação, a 37°C, pelo surgimento de zonas claras (halo) ao redor indicando o efeito inibitório de um microrganismo sobre o outro. Os diâmetros de zonas de inibição em torno discos foram medidos com auxílio de um paquímetro e os resultados expressos em milímetros. Foram considerados com ação inibitória apenas os halos superiores a 6 mm.

2.6 Resistencia a antibióticos

A resistência dos isolados bacterianos aos antibióticos foi determinada de acordo com as recomendações do manual do Instituto de Padrões Clínicos e de Laboratório (CLSI, 2017) utilizando o Polisensidisc 15 (Polisensidisc, DME®). O método de difusão em disco foi utilizado para testar quinze antibióticos a saber: Ciprofloxacina (CIP 05 µg), Linezolida (LNZ 30 µg), Gentamicina (GEN 10 µg), Ampicilina (AMP 10 µg), Oxacilina (OXA 01 µg), Penicilina (PEN 10 µg), Tetracina (TET 30 µg), Cefoxitina (CFO 30 µg),

Azitromicina (AZI 15 µg), Sulfazotrim (SUT 20 µg), Vancomicina (VAN 30 µg), Clindamicina (CLI 02 µg), Eritromicina (ERI 15 µg), Cloranfenicol (CLO 30 µg), Rifampicina (RIF 05 µg). Para este teste foi utilizada uma suspensão de cada isolado bacteriano do pescado na concentração aproximada de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL. Essa padronização foi efetuada por meio de análise espectrofotométrica a 600nm para confirmação da concentração de microrganismos. Após padronização, esses isolados foram semeados, em superfície, em placas contendo ágar Muller Hilton. Em seguida, os discos contendo os antibióticos foram aplicados sobre as placas já semeadas. As placas foram incubadas a 37°C por 24h, os diâmetros de zonas de inibição do crescimento em torno discos foram medidos com paquímetro e os resultados expressos em milímetros.

3 RESULTADOS

3.1 Qualidade microbiológica

Na tabela 1 encontram-se os dados obtidos da avaliação da qualidade microbiológica do pescado. A contagem de bactérias mesófilas aeróbias variou de 6.20 a 6.24 log UFC/g para a espécie de Pescada Gó e de 7.18 a 7.20 log UFC/g para a Pratiqueira.

Tabela 1: Valores médios da qualidade microbiológica do pescado.

AMOSTRAS	Bactérias Mesófilas Aeróbias (log UFC/g)	Bactérias Psicotróficas (log UFC/g)	Coliformes Totais (log UFC/mL)	Coliformes Termotolerantes (NMP/mL)
PESCADA GÓ 1	6.20	5.90	3.20	1.100
PESCADA GÓ 2	6.23	6.10	3.30	1.100
PESCADA GÓ 3	6.24	6.10	3.30	1.100
PRATIQUEIRA 1	7.18	5.40	4.10	> 1.100
PRATIQUEIRA 2	7.18	5.40	4.10	> 1.100
PRATIQUEIRA 3	7.20	5.60	4.10	> 1.100

A legislação brasileira não estabelece valores limites para peixes frescos, porém a Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos (ICMSF, 2002) recomenda que os limites de aeróbios mesófilos não devem exceder os valores de 7.0 log UFC/g em amostras de peixe refrigeradas para consumo humano. Neste estudo verificou-se, que a contagem de aeróbios mesofilos para a pescada gó estão dentro do limite recomendado pela legislação. Entretanto, estão acima quando verificados para a Pratiqueira.

Resultados encontrados nesse estudo foram semelhantes aos obtidos por Damasceno et al, (2015) que encontraram contagem de aeróbios mesófilos, em peixes amazônicos, com valores que alternaram entre 6.03 a 8.23 log UFC/g para piramutaba (*Brachyplatystoma vailantii*) e 4.2 a 7.2 log UFC/g para o Tucunaré (*Cichla ocellaris*). Araújo et al., (2012), avaliando Tambaqui (*Colossoma macropomum*) encontraram contagens com valores de 4.30 a 5.18 log UFC/g. E no estudo de peixes comercializados em feira livre do município de Vitória da Conquista – BA, Oliveira et al., (2011) obtiveram valores entre 5.0 a 6.0 log UFC/g. Entretanto, Rodrigues et al., (2008) ao avaliarem músculos de tilápia com e sem pele, encontraram valores de mesofilos aeróbios de 9.40 log de UFC/g e de 7.90 log UFC/g, respectivamente.

Para os padrões de qualidade, os valores de mesófilos encontrados para a Pratiqueira pode estar associado a existência de não conformidade ao longo das cadeias comercialização.

Verifica-se ainda na Tabela 1 que os resultados encontrados na contagem de aeróbios psicotróficos, que as espécies objeto desse estudo, apresentaram valores coerentes, dentro do que foi recomendado pela ICMSF (2002) que estabelece limite máximo de 7 log UFC/g. Obtiveram valores entre 5.90 - 6.10 logs UFC/g para pescada gó e 4.00 – 6.10 logs UFC/g para pratiqueira. Valores semelhantes foram obtidos por Britto et al., (2007) ao avaliarem a deterioração bacteriológica de jaraqui (*Semaprochilodus* spp.) capturados na região amazônica, que encontraram uma contagem de bactérias aeróbias psicotróficas variando de cerca de 2.0 – 3.0 logs UFC/g. Sousa (2011) ao avaliar file e posta de peixes amazônicos, inclusive a pescada gó, obteve valores entre 4.5 – 7.7 log UFC/g respectivamente. Em peixes mantidos sobre refrigeração, as bactérias psicotróficas atuam diretamente na deterioração dos peixes porque se multiplicam bem nessas condições

No presente estudo foram obtidos valores de coliformes totais entre 3.20 - 3.30 logs UFC/ml para a pescada gó e 4.10 log UFC/ml para a Pratiqueira, esta análise não

indica a presença de patógenos, mas segundo Agnese et al., (2001) ela é importante para detectar deterioração potencial do produto e sua vida de prateleira média. E apesar de não existir um valor limite estabelecido pela legislação com relação ao valor de coliformes totais, para coliformes termotolerantes a legislação brasileira estabelece o valor de 2 log nmp/g, como o padrão máximo aceitável para em peixes e produtos da pesca (brasil, 2002). A pratiqueira apresentou valores superiores ao recomendado pela legislação. Por serem indicadores de qualidade higiênica, os resultados de coliformes totais e termotolerantes mostram que a amostra apresentou uma contaminação externa o que reflete uma melhoria na qualidade das práticas de comercialização.

3.2 Identificação da estirpe bacteriana

Foram isoladas um total de 49 cepas, mas para este estudo só foram contabilizadas as cepas bacterianas que obtiveram uma taxa de precisão superior a 70% na identificação das bactérias pelos kits. Portanto, foram identificadas 33 cepas nessa faixa de precisão, as demais não foram consideradas ou não constavam no banco de dados fornecidos pelo perfil do kit. A identificação dessas espécies pode ser observada na Figura 1.

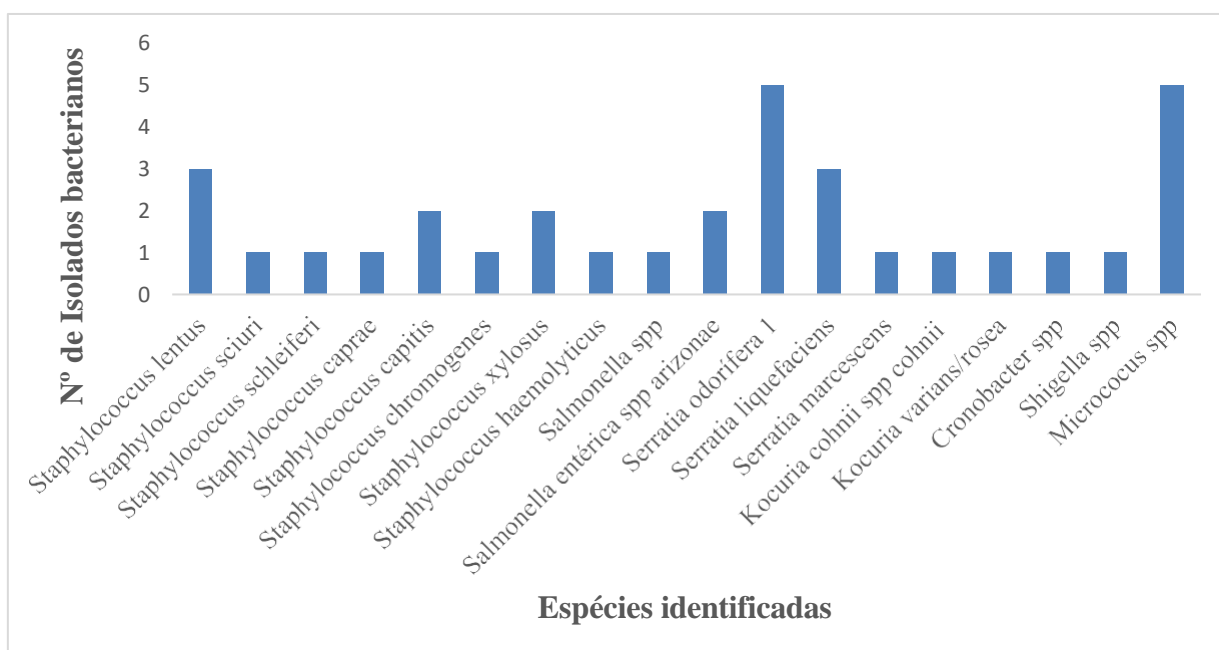


Figura 1: Número de isolados bacterianos do pescado identificados por espécie.

Destas cepas identificadas, 57,58% foram Gram Positivas e 42,48% Gram negativas. Este isolamento obteve resultados coerentes, quando comparado com Damasceno et al., (2015) que obtiveram 36 cepas isoladas de peixes amazônicos das espécies Tucunurará e Piramutaba, entre os isolados observou-se que 58,33% eram Gram positivo e 41,67% Gram negativo. Mas Alves et al., (2016) obtiveram isolados de Pescadinha Real e encontraram mais gram negativos (52,94%) do que gram positivos (47,06%).

A identificação das bactérias, o número de isolados e a taxa que indica a similaridade do perfil dos isolados com os padrões estabelecidos pelos kits estão nas Tabelas 2, 3, 4 e 5.

Em relação a identificação das espécies bacterianas os dados descritos na Tabela 2 mostram que as bactérias Gram positivas da Pescada Gó pertencem a 9 espécies diferentes, sendo que 7 são do gênero *Staphylococcus* (77,7 %). A espécie predominante foi *Micrococcus* spp, com 25% de ocorrência, pertencente ao gênero *Micrococcus* e foi encontrado uma espécie de *Kocuria varians/rósea*.

Tabela 2: Identificação de bactérias Gram positivas isoladas de Pescada Gó.

Bactérias Isoladas	Número de bactérias isoladas	Bactérias isoladas (%)	% ID*
<i>Staphylococcus lentus</i>	1	8,33	99,9
<i>Staphylococcus sciuri</i>	1	8,33	99,9
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	1	8,33	64,4
<i>Staphylococcus caprae</i>	1	8,33	50,8
<i>Staphylococcus capitis</i>	2	16,67	97,4
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	1	8,33	89,7
<i>Staphylococcus cohnii</i> spp <i>cohnii</i>	1	8,33	98,9
<i>Micrococcus</i> spp	3	25,00	96,7
<i>Kocuria varians/rósea</i>	1	8,33	97,0

* indica a similaridade do perfil dos isolados com os padrões estabelecidos pelos kits, de acordo com o fabricante.

Essas cepas identificadas do intestino dos peixes são consideradas bactérias oportunistas e de deterioração, elas não fazem parte da microbiota natural do pescado e podem desempenhar um papel direto na qualidade desse pescado, implicando na vida útil dos mesmos.

O mesmo perfil de bactérias gram positivas foi verificado na Pratiqueira, onde foram identificadas 4 espécies, como observado na Tabela 3. Sendo que 71,43% são do gênero *Staphylococcus*. A menor ocorrência foi de *Staphylococcus haemolyticus*, totalizando 14,29%. E as demais bactérias identificadas obtiveram frequências iguais de 28,57% para *Micrococcus spp* e *Staphylococcus xylosus*.

Tabela 3: Identificação de bactérias Gram positivas isoladas da Pratiqueira.

Bactérias Isoladas	NBI	BI (%)	ID (%)
<i>Micrococcus spp</i>	2	28,57	99,1
<i>Staphylococcus xylosus</i>	2	28,57	94,1
<i>Staphylococcus lentus</i>	2	28,57	99,6
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1	14,29	96,1

* indica a similaridade do perfil dos isolados com os padrões estabelecidos pelos kits, de acordo com o fabricante; NBI = número de bactérias isoladas; BI= bactérias isoladas

As bactérias Gram positivas *Micrococcus spp* e *Staphylococcus lentus* foram encontradas tanto na Pratiqueira quanto na Pescada Gó, fornecendo assim um perfil similar entre as espécies de peixes analisadas.

Essas bactérias que foram isoladas são de importância na área médica, e a identificação de *Staphylococcus* sinaliza alerta de segurança alimentar, pois segundo Neto et al., (2002) esse gênero é o agente responsável por aproximadamente 45% das toxinfecções no mundo, cuja contaminação pode ocorrer durante os estágios de produção ou estocagem do alimento, por cepas de origem ambiental ou humana.

A presença desse microrganismo no pescado é devido a sua grande resistência ao meio ambiente, facilitando a sua sobrevivência. E requer atenção, pois mesmo com antimicrobianos existentes, da melhora das condições sanitárias e das medidas de controle de infecção, este microrganismo continua a ser um dos mais importantes patógenos para o homem.

E dentre os isolados, o *S. haemolyticus* destaca-se devido a sua à resistência aumentada aos antimicrobianos, e por ser comumente confundido com o *S. aureus*, pois apresenta hemólise na placa de ágar sangue de carneiro.

Estirpes gram positivas como *Staphylococcus spp.*, *Micrococcus spp.* e *Bacillus spp.* foram isolados de peixes marinhos tropicais por Al-Bulushi et al., (2010). *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus succinus* e *Staphylococcus xylosus* foram isolados (Couto et al., 2001; Nováková et al., 2006; Petinaki et al., 2001). De acordo com esses autores, as espécies mais prevalentes foram *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus carnosus* e *Staphylococcus equorum*. Uma dessas espécies (*Staphylococcus xylosus*) também foi a mais comumente isoladas no presente estudo. Foram encontrados *Staphylococcus lentus* por Damasceno et al., (2015) isolados de Piramutaba (*Brachyplatystoma vailantii*). Isoladas de Tucunaré (*Cichla ocellaris*) foram *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus cohnii* spp *cohnii*, tornando similar o aparecimento dessas espécies em alguns peixes amazônicos. Ainda segundo Damasceno, houve ocorrência em Dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) e Filhote (*Brachyplatystoma filamentosum*) das espécies de *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus schleiferi* e *Staphylococcus cohnii* spp *cohnii*. A identificação dessas bactérias cria um perfil característico de similaridade das bactérias presentes nos peixes da Região Amazônica, visto que a microbiota dessa região ainda é pouco conhecida.

A maioria das enterobactérias são encontradas no trato gastrointestinal de humanos, no reino animal, na água, solo e vegetais, portanto facilita o seu isolamento do pescado. Os resultados referentes à identificação de bactérias Gram negativas isoladas da Pratiqueira estão exibidos na Tabela 4.

Quanto a classificação, 60% são da espécie *Serratia* e a maior ocorrência foi de *Serratia odorífera* 1, totalizando 40% das bactérias identificadas. Foram encontradas *Salmonella* spp e *Salmonella entérica* spp *arizonae*, além de *Cronobacter* spp e *Shigella* spp. Algumas são consideradas enteropatógenos por causarem preferencialmente infecções gastrointestinais como a *Salmonella typhi*, outras salmonellas, *Shigella* spp.

Tabela 4: identificação de bactérias Gram negativas isoladas da Pratiqueira.

Bactérias Isoladas	NBI	BI (%)	ID (%)
<i>Serratia odorífera</i> 1	4	40,00	99,9
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	10,00	70,2
<i>Serratia marcescens</i>	1	10,00	88,5
<i>Salmonella spp</i>	1	10,00	89,6
<i>Salmonella entérica spp arizonae</i>	1	10,00	99,8
<i>Cronobacter spp</i>	1	10,00	70,8
<i>Shigella spp</i>	1	10,00	81,5

* indica a similaridade do perfil dos isolados com os padrões estabelecidos pelos kits, de acordo com o fabricante; NBI = número de bactérias isoladas; BI= bactérias isoladas

A identificação das bactérias Gram negativas da Pescada Gó está descrita na Tabela 5. Foram encontradas 3 espécies diferentes, *Salmonella entérica spp arizonae*, *Serratia odorífera* 1 e *Serratia liquefaciens*. Esta última obteve um percentual de 50% de ocorrência. Quanto ao gênero, a *Serratia* obteve um percentual de 75%. E houve presença de *Salmonella entérica spp arizonae*.

Tabela 5: identificação de bactérias Gram negativas isoladas da Pescada Gó.

Bactérias Isoladas	NBI	BI (%)	ID(%)
<i>Salmonella entérica spp arizonae</i>	1	25,00	99,7
<i>Serratia liquefaciens</i>	2	50,00	97,2
<i>Serratia odorífera</i> 1	1	25,00	99,8

NBI = número de bactérias isoladas; BI= bactérias isoladas

Dentre os isolados bacterianos, destacam-se a *Salmonella* spp e *Shigella* spp como maiores causadoras de infecções.

Enterobacteriaceae tem sido frequentemente isolada dos aparelhos digestivos de carne de peixes de água doce (Austin, 2002; Yagoub, 2009; Gonzalez-Rodriguez et al., 2002; Paludan-Müller et al., 1998). Damasceno et al., (2015) verificou a presença de *Serratia marcescens* em Piramutaba e Dourada, foi encontrado também *Serratia liquefaciens* em Tucunaré e Filhote.

A presença de *Serratia* encontrada em ambos os peixes estudados é tida como um deteriorador importante. A sua presença acelera o processo de decomposição do pescado.

E a *Salmonella* spp, por ser uma bactéria entérica responsável por graves intoxicações alimentares, é um dos principais agentes envolvidos em surtos registrados em vários países. A sua presença em alimentos é um relevante problema de saúde pública (MAIJALA R, RANTA J, SEUNA, 2005). Foi isolado também *Cronobacter* spp, que é classificada como um patógeno emergente, comumente encontrada em vários tipos de alimentos, sendo considerada uma bactéria oportunista. Elas não fazem parte da microbiota normal do peixe, suas presenças podem estar associadas à manipulação inadequada em qualquer uma das etapas da cadeia produtiva ou por contato com águas contaminadas, através das bacias pesqueiras, pelas descargas de efluentes de esgoto, que representam importante via de transmissão destas bactérias para os peixes.

3.3 Atividade antibacteriana dos microrganismos isolados

Neste estudo foram considerados como atividade inibitória apenas os halos com diâmetros superiores a 6 mm.

Os resultados dos diâmetros dos halos de inibição pelo método de disco-difusão dos isolados bacterianos da Pescada Gó e Pratiqueira encontram-se na Tabela 6.

Das 33 cepas bacterianas que foram identificadas, 14 apresentaram atividade antimicrobiana frente aos patógenos testados, correspondendo a 42,42% de ação inibitória, mostrando espectro de ação relevante. Os isolados obtidos do trato intestinal da pescada Gó (*Mugil curema*) mostravam maior eficiência de inibição do que os da Pratiqueira (*Macrodon ancylodon*) alcançando 24,24% e 18,18% das cepas avaliadas, respectivamente.

Tabela 6: Diâmetro dos halos de inibição obtidos pelo método de disco-difusão para Pescada Gó (*Mugil curema*) e Pratiqueira (*Macrodon ancylodon*).

Bactérias pescada Gó		Patógenos / Halos de inibição (mm)	
Microrganismo	<i>Salmonella Typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Staphylococcus lentus</i>	---	8,75 ± 0,49	
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	---	13,7 ± 0,57	
<i>Staphylococcus capitis</i>	---	7,00 ± 1,41	
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	---	6,55 ± 0,78	
<i>Staphylococcus sciuri</i>	---	6,65 ± 0,49	
<i>Kocuria varians/rósea</i>	8,30 ± 0,42	---	
<i>Serratia liquefaciens</i>	6,75 ± 0,92	7,75 ± 0,35	
<i>Staphylococcus xylosus</i>	---	10,5 ± 0,71	

Bactérias Pratiqueira		Patógenos / Halos de inibição (mm)	
Microrganismo	<i>Salmonella Typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Staphylococcus lentus</i>	8,00 ± 0,00	---	
<i>Staphylococcus xylosus</i>	7,05 ± 0,07	---	
<i>Serratia marcescens</i>	7,00 ± 0,00	---	
<i>Serratia odorífera 1</i>	6,10 ± 0,14	---	
<i>Cronobacter spp</i>	6,70 ± 0,71	---	
<i>Shigella spp</i>	---	8,75 ± 0,35	

Legenda: Média das duplicatas dos halos de inibição em milímetros (mm) ± desvio padrão.

Os halos de inibição contra os microrganismos indicadores testados apresentaram variações de 6,10 - 8,30 mm frente *S. Typhimurium* e 6,55 - 13,7 mm para *S. aureus*, além disso o *S. aureus* mostrou ser susceptível a uma quantidade maior de microrganismos quando comparado a *S. Typhimurium*. Os dados apresentados foram inferiores aos encontrados por Jatoba et al. (2008) que verificaram halos de inibição que variaram de 13,02 mm a 15,07 mm, ao avaliar a utilização de bactérias isoladas do trato intestinal de Tilapias do Nilo. Porém, Cizeikiene et al. (2013) ao avaliar a atividade antimicrobiana de bactérias de ácido láticas contra microrganismos patogênicos e deterioradores isolados de alimentos, verificou halos que variaram entre 6,55 a 8,50 contra *S. Typhimurium*, semelhantes ao encontrados neste trabalho.

Entre os isolados bacterianos da pescada Gó apenas a espécie de *Kocuria varians/rósea* não inibiu o *S. aureus*, mas mostrou um bom resultado ao conseguir inibir a *S. Typhimurium*. Já a espécie de *Serratia liquefaciens* mostrou atividade inibitória contra os dois patógenos testados (Tabela 6).

Para os isolados bacterianos da Pratiqueira (Tabela 6), a bactéria gram negativa *Shigella spp* foi o único microrganismo que mostrou inibição contra *S. aureus*, porém não

conseguiu inibir a *S. Typhimurium*. Nenhum dos isolados bacterianos da Pratiqueira conseguiram apresentar inibição aos dois patógenos ao mesmo tempo.

Os maiores halos de inibição foram verificados a bactéria gram positiva, *S. aureus*. Mostrando-se mais sensível que a bactéria gram negativa *S. Typhimurium*. Essa sensibilidade maior pode ser explicada pela diferença nas estruturas, principalmente na parede bacteriana, facilitando a ação dos antimicrobianos testados nas gram positivas.

3.4 Suscetibilidade aos antibióticos

Foram testados 15 agentes antimicrobianos para cada uma das 14 espécies identificadas que mostraram ação inibitória frente os patógenos testados. Na tabela 7 estão os halos de sensibilidade desses microrganismos aos antibióticos.

Tabela 7: Diâmetro dos halos sensibilidade ou resistência a antibióticos dos isolados bacterianos da Pescada Gó e Pratiqueira.

Bactéria	Antibióticos / Halos de inibição (mm)														
	CIP 05	LNZ 30	GEN 10	AMP 10	OXA 01	PEN 10	TET 30	CFO 30	AZI 15	SUT 25	VAN 30	CLI 02	ERI 15	CLO 30	RIF 05
<i>Staphylococcus lentus</i>	26,6	31,0	25,9	19,5	13,7	16,5	17,7	29,5	23,5	26,0	15,5	20,5	22,5	25,3	6,5
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	28,7	30,9	26,9	20,7	11,9	15,8	27,9	27,6	23,4	27,5	18,9	16,5	24,8	25,0	14,9
<i>Staphylococcus capitis</i>	27,7	30,8	26,0	20,2	13,4	12,2	13,0	26,5	20,8	26,5	16,9	21,5	24,0	25,5	15,0
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	27,9	34,9	30,0	11,8	10,9	11,7	14,5	27,9	22,8	25,5	11,85	21,0	26,7	26,5	-
<i>Staphylococcus sciuri</i>	30,8	32,6	27,8	17,7	14,8	12,9	16,45	29	23,1	27	20,9	21,0	23,5	27,0	16,1
<i>Kocuria varians/rosea</i>	30,4	31,9	24,8	-	12,6	15,6	17,5	28,7	23	26,9	20,5	20,0	23,0	26,5	16,9
<i>Serratia liquefaciens</i>	24,6	30,1	25,8	-	16,9	-	28,6	27,1	19,6	24,5	14,9	24,5	26,0	26,5	12,0
<i>Staphylococcus xylosus</i>	20,0	30,9	18,8	23,7	7,55	17,7	19,5	15,8	7,7	18,9	16,9	28,8	29,85	29,9	-
<i>Staphylococcus lentus</i>	28,5	34,0	27,0	11,0	11,0	9,5	20,5	29,9	22,0	25,5	14,0	21,0	26,0	26,0	-
<i>Staphylococcus xylosus</i>	28,9	32,4	27,0	-	12,0	-	20,4	28,0	22,5	26,5	15,9	18,6	27,0	27,5	-
<i>Serratia marcescens</i>	29,0	31,5	26,0	20,0	-	-	18,0	27,0	26,5	25,5	19,0	19,9	25,5	24,8	-
<i>Serratia odorífera 1</i>	28,0	30,3	29,0	12,00	17,0	-	19,0	29,0	30,0	26,5	15,5	20,5	22,5	26,0	12,8
<i>Cronobacter spp</i>	21,8	29,5	26,5	18,5	18,5	-	17,0	28,0	22,0	27,5	12,7	20,5	11,5	22,0	-
<i>Shigella spp</i>	27,9	30,5	29,0	-	-	-	17,0	29,0	-	29,0	15,0	-	-	21,3	-

Legenda: Acima da linha divisórias são bactérias da pescada gó, abaixo são as pertencentes a pratiqueira; Ciprofloxacina (CIP), Linezolida (LNZ), Gentamicina (GEN), Ampicilina (AMP), Oxacilina (OXA), Penicilina (PEN), Tetracina (TET), Cefoxitina (CFO), Azitromicina (AZI), Sulfazotrim (SUT), Vancomicina (VAN), Clindamicina (CLIN), Eritromicina (ERI), Cloranfenicol (CLO), Rifampicina (RIF).

Os antibióticos testados foram: Ciprofloxacina (CIP), Linezolida (LNZ), Gentamicina (GEN), Ampicilina (AMP), Oxacilina (OXA), Penicilina (PEN), Tetracina (TET), Cefoxitina (CFO), Azitromicina (AZI), Sulfazotrim (SUT), Vancomicina (VAN), Clindamicina (CLI), Eritromicina (ERI), Cloranfenicol (CLO), Rifampicina (RIF).

Entre os 15 antibióticos, 8 deles tiveram 100% de eficácia contra todos os isolados bacterianos. Esses antibióticos foram: Ciprofloxacina, Linezolida, Gentamicina, Tetracina, Cefoxitina, Sulfazotrim, Vancomicina e Cloranfenicol, resultados apresentados na tabela 7. Em contrapartida, a Rifampicina teve maior número de microrganismos resistentes (50%), seguida pela Penicilina (42,8%), Ampicilina (28,57%), Oxacilina (14,28%). Azitromicina, Clindamicina e Eritromicina correspondem a 7,14% de resistência a cada um.

A sensibilidade à Ciprofloxacina (CIP) foi detectada em 100% dos isolados de *A. cryaerophilum*, no estudo de González et al. (2017). Vandenberg et al., (2006) também descobriram que a maioria dos isolados de *A. butzleri* eram suscetíveis à ciprofloxacina (96,7%). Van den Abeele et al. (2016) obtiveram resultados semelhantes de isolados de *Arcobacter*, a maioria das cepas foram suscetíveis à ciprofloxacina (87%). Verificando assim que este antibiótico possui bastante eficácia no combate dessas bactérias estudadas.

A *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens* e *Serratia odorifera* 1 (Tabela 7) se mostraram resistentes a AMP e PEN. A *S. liquefaciens* por ser um patógeno oportunista, capaz de colonizar grande variedade de superfície de água e trato digestivo de peixes, poderá ter o seu potencial antimicrobiano e de resistência a antibióticos bem aproveitado na aquicultura.

A *Kocuria varians/rosea* mostrou resistência a um agente de antibiótico. Devido a casos crescentes de infecções que estão sendo relacionados a essa bactéria, o seu poder de resistência a AMP verificado na Tabela 7 a torna um agente patogênico em potencial. Logo, esta bactéria se torna um desafio para identificar os padrões de suscetibilidade a antibióticos. A resistência à ampicilina foi observada para *Enterococcus* em ambos os estudos de Bennani et al., Fernández-Delgado e Suárez (4,3% e 20,0%, respectivamente), no presente estudo foi observado 28,5%.

Os microrganismos isolados da Pescada Gó *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus schleiferi*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus sciuri* e *Staphylococcus xylosus* foram sensíveis ao antibiótico OXA (Tabela 7). Já *Staphylococcus chromogenes* e *Staphylococcus xylosus* mostraram

resistência ao antibiótico RIF, o mesmo foi observado para as bactérias *Staphylococcus lentus* e *Staphylococcus xylosum* da Pratiqueira.

As bactérias isoladas da Pratiqueira apresentam algumas características diferentes das encontradas na pescada Gó, apesar de possuírem espécies em comum, como o *Staphylococcus xylosum* e *Staphylococcus lentus*. Mostraram resistência a AMP (*Staphylococcus xylosum* e *Shigella spp*), PEN (*Staphylococcus xylosum*, *Serratia marcescens*, *Serratia odorífera*, *Cronobacter spp* e *Shigella spp*), OXA (*Serratia marcescens* e *Shigella spp*), AZI e CLI (*Shigella spp*), RIF (*Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus xylosum*, *Serratia marcescens*, *Cronobacter spp* e *Shigella spp*). Contabilizando 83% de resistência a PEN e RIF. A bactéria gram negativa *Shigella spp* mostrou resistência contra 46% dos antibióticos.

Neste estudo dos isolados bacterianos do pescado e a sua resistência aos antibióticos, mostram que os alimentos podem ser um ambiente apropriado para cepas resistentes e multirresistentes e a cadeia alimentar pode desempenhar um papel fundamental na transmissão de resistência entre o meio ambiente e os seres humanos (Chajęcka-Wierzchowska et al., 2012; Guran e Kahya, 2015; Nunes et al., 2015; Podkowik et al., 2012). Neste estudo, 3 cepas de *Staphylococcus* se mostraram resistente a antibióticos e precisam de maior atenção, em razão do grande número de casos em que os *Staphylococcus* estão implicados em surtos de infecções relacionadas com alimentos e intoxicação alimentar (Batista et al., 2013; Chajęcka-Wierzchowska et al., 2015; Fowoyo e Ogunbanwo, 2016; Podkowik et al., 2016; Vasconcelos et al., 2011; Zell et al., 2008).

No presente estudo, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus xylosum* e *Staphylococcus lentus* apresentaram resistência a RIF. Além desse antibiótico, *Staphylococcus xylosum* apresentou resistência a AMP e PEN. Autores como Nunes et al. (2015), Fijałkowski et al. (2016) encontraram resistência de *Staphylococcus xylosum* à Meticilina.

Os resultados mostraram as bactérias gram positivas se mostraram mais sensível aos microrganismos que foram testados contra elas e aos antibióticos, sugerindo que seja por causa da morfologia estrutural dessa bactéria. Pois segundo Tadeu et al. (2005), são as bactérias gram negativas que apresentam resistência contra muitos agentes antimicrobianos.

Traçar um perfil de bactérias presentes no trato intestinal dessas duas espécies não significa que elas terão suas características iguais. Embora algumas possam se

complementar, outras atuarão de maneira distinta. Isso está relacionado ao fato de cada espécie apresentar uma alimentação diferente, está sujeita a contaminação do meio, o manejo e o acondicionamento diferenciados. Esses fatos evidenciam a importância de conhecer a flora bacteriana desses peixes, a sua resistência antimicrobiana a bactérias patogênicas e a sua resistência a antibióticos. Visto que são peixes muito consumidos pela população e de grande ocorrência na região Amazônica.

4 CONCLUSÃO

O isolamento e a identificação de bactérias das duas espécies do pescado demonstraram uma diversidade entre os isolados, criando um perfil de similaridade com outros estudos. Trouxe como contribuição o estudo de 18 espécies de bactérias de importância clínica isoladas do pescado da região Amazônica. As maiores ocorrências foram de *Serratia odorífera* 1 e *Micrococcus spp.*

Quanto ao perfil de resistência a antibióticos, Ciprofloxacina, Linezolida, Gentamicina, Tetracina, Cefoxitina, Sulfazotrim, Vancomicina e Cloranfenicol conseguiriam inibir todas as bactérias, se mostrando 100% eficientes.

A bactéria que se mostrou mais resistente foi a *Shigella spp.*, resistiu a 7 dos 15 antimicrobianos testados.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, R. Probiotics: an emerging food supplement with health benefits. **Food Biotechnology**, v. 19, p. 227- 46, 2005.
- AL-BULUSHI, I. M.; POOLE, S.E.; BARLOW, R.; DEETH, H.C.; DYKES, G.A. Speciation of Gram-positive bacteria in fresh and ambient-stored subtropical marine fish. **International Journal Food Microbiology**, v. 138, p. 32-38, 2010.
- GONZÁLEZ, A.; MOREJÓN, I. F. B.; FERRÚS, M.A. Isolation, molecular identification and quinolone-susceptibility testing of *Arcobacter* spp. isolated from fresh vegetables in Spain. **Food Microbiology**, v. 65, p. 279-283, 2017.
- BATISTA, V. S.; ISAAC, V. J.; VIANA, J. P. Exploração e manejo dos recursos pesqueiros na Amazônia. In: RUFFINO, M. L. (Ed.). **A pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia**. Manaus: Ibama/Pro-varzea, p. 63-151, 2004.
- CHAO, N. L. A draft of Brazilian freshwater fishes for the hobby-a proposal to IBAMA. **Ornamental Fish International Journal**, v.23, p. 11-19, 1998.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Twenty-fifth Informational Supplement. v.35, n. 3, 2015.
- COTTER, D.P.; HILL, C.; ROSS, R.P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v 3, p. 777-788, 2005.
- CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology**, v. 8, n.7, p. 1137–1144, 2006.
- DAMASCENO, E.I.T.; PANTOJA, L.N.G.; FIGUEIREDO, H.M.; MELLER, L.H.; RODRIGUES, A.M.C. Microbiota of two species of commercially importante fish in the Amazon region (Belém-Pa-Brazil): Butterfly peacock bass (*Cichla ocellaris*) and Piramutaba (*Brachyplatystoma vailantii*). **African Journal Microbiology Research**, v 9, n. 9, p. 572-580, 2015.
- DAMASCENO, E.I.T.; PANTOJA, L.N.G.; FIGUEIREDO, H.M.; MELLER, L.H.; RODRIGUES, A.M.C. Microbiota of freshwater catfish species, Filhote (*Brachyplatystoma filamentosum*) and Dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) from the Amazon Region (Belém-Pará-Brazil). **African Journal Microbiology Research**, v. 10, n. 13, p. 445-455, 2016.
- DEEGAN, L.H.; COTTER, P.D.; HILL, C. ROSS, P. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1058-1071, 2006.
- FARIAS, M.C.A; FREITAS, J.A. **Qualidade microbiológica de pescado beneficiado em indústrias paraenses**. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v. 67, n. 2, p. 113-117, 2008.

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

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. Contaminación, conservación y alteración del pescado y otros alimentos marinos. In: **Microbiología de los alimentos**. Zaragoza, España: Acribia, cap.15, p.325-340, 2003.

GALIA, W.; PERRIN, C.; GENAY, M.; DARY, A. Variability and molecular typing of *Streptococcus thermophilus* strains displaying different proteolytic and acidifying properties. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 89-95, 2009.

GÁLVEZ, A.; LÓPEZ, R.L.; ABRIOUEL, H.; VALDIVIA, E.; OMAR, N.B. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. **Critical Review Biotechnology**, v.28, n.2, p. 125-152, 2008.

GOBELI, S.; GOLDSCHMIDT CLERMONT, E.; FREY, J.; BURR, S. E. *Pseudomonas chlororaphis* strain JF3835 reduces mortality of juvenile perch, *Perca fluviatilis* L., caused by *Aeromonas sobria*. **Journal of Fish Diseases**, v. 32, p. 597–602, 2009.

ISAAC, V. J. S.; ESPÍRITO, R.V. **Peixes e Camarões do estuário do litoral bragantino**. MADAM, p. 268, 2005.

JATOBÁ A., VIEIRA F.N., BUGLIONE N.C., SILVA B.C., MOURIÑO J.L.P., JERÔNIMO G.T., DOTTA G.; MARTINS M.L. **Utilização de bactérias ácido-lácticas isoladas do trato intestinal de tilápia-do-nilo como probiótico**. Pesquisa Agropecuária Brasileira. v. 43, n. 9, p. 1201-1207, 2008.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. Sexta edição – Porto Alegre: Artmed. p. 711, 2005.

KIM, D. H.; AUSTIN, B. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 21, p. 513-524, 2006.

LALITHA, K.V.; SURENDRAN, P.K. Microbiological changes in farm reared freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) in ice. **Food Control**, v. 17, p. 802-807, 2006.

LIMA, M.R.F.; XIMENES, C.P.A.; LUNA, J.S.; SANT'ANA, A.E.G. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Rev Bras Farmacogn**, v.16, p. 300-306, 2006.

MAIJALA, R.; RANTA, J.; SEUNA, E. The efficiency of the Finnish *Salmonella* Control Programme. **Food Control**. v. 16, n. 8, p. 669-675. 2005.

MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. F.; FRANCO, B. D. G. M. Bioconservação de alimentos: Aplicação de bactérias lácticas e suas bacteriocinas para a garantia da segurança microbiológica de alimentos. **Biociência e Desenvolvimento**, v. 29, p. 114-119, 2003.

MATTILA-SANDHOLM, T. et al. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v.12, p. 173-182, 2002.

MENEZES, N. A. *Guia prático para conhecimento e identificação das tainhas e paratis (Pisces, Mugilidae) do Litoral Brasileiro*. **Revista Brasileira de Zoologia**. v. 2, p. 1-12, 1983.

MMA-IBAMA-CEPNOR-SECTAM. **Relatório estatístico da pesca marítima do Estado do Pará**. Relatório Técnico, SECTAM, Belém, p. 28, 2011,

MUZZOLÓN, J. **Uso de bacterias lácticas y/o levaduras en la prevención de aflatoxicosis en animales de compañía**. Monografía (Título de Microbiólogo), Facultad de Ciencias Exactas, Físico - Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto. p. 110, 2010.

OLIVEIRA, M.N. Probióticos: seus benefícios a saúde humana. **Nutrição em Pauta**, v. 15, n.87, 2007.

POPPI, L. B; MANCILHA, I. M; FERREIRA, A. J. P.; LEAL, D. D. M. Nota prévia: Avaliação do efeito antagônico de espécies de *Lactobacillus* sobre *Listeria monocytogenes* in vitro. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.11, p. 113-119, 2008.

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. **Microbiology. 5th edition**. The McGraw-Hill Companies, p. 1139, 2002.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D.B. **Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma**. São Paulo: Atheneu. 2005.

ROUSE, S.; HARNETT, D.; VAUGHAN, A.; VAN SINDEREN, D. Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 915-923, 2007.

SANTOS, T.M. Inspeção visual e avaliações bacteriológicas e físico-químicas da carne de piramutaba (*Brachyplastioma vaillanyi*) congelada. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 6, p. 1538-1545, 2004.

SANTANA, J. V. **Aspecto da pesca e da biologia da pescada-gó, *Macrodon ancylodon*** (Bloch & Schneider, 1801) da costa Norte do Brasil. Dissertação de mestrado. Universidade federal do Ceará, Fortaleza, p. 106, 2008.

SANTOS, G. M.; MÉRONA, B. J.; ANASTÁCIO, A.; JÉGU, M. **Peixes do Baixo Tocantins: 20 anos depois da Usina Hidrelétrica Tucuruí**. ELETRONORTE, Brasília, p. 216, 2004.

SANTOS, S. S. **Caracterização genética, taxonomia molecular e biogeografia da pescada-gó (*Macrodon ancylodon* - Sciaenidae) da costa atlântica da América do Sul**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Pará, Bragança, p. 103, 2006.

TADEG H, ASRES K, GEBRE-MARIAM T. Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders. **Jounal Ethnopharmacol**, v. 100, p. 168-175. 2005.

TEUBER, M. Veterinary use and antibiotic resistance. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, p. 493- 499, 2001.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, A. L. **Microbiologia**. 8^a edição, 1^a reimpressão, Artmed, Porto Alegre, p. 894, 2006.

VAN DEN ABEELE, A.M., VOGELAERS, D., VANLEARE, E., Houf, K. Antimicrobial susceptibility testing of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* strains isolated from Belgian patients. **Jounal Antimicrobiology Chemother**, v. 71, p.1241-1244, 2016.

VANDENBERG, O.; HOUF, K.; Douat, N.; VLAES, L.; RETORE, P.; BUTZLER, J.P.; DEDISTE, A., 2006. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of non-jejuni/coli campylobacters and arcobacters from Belgium. **J.Antimicrobiology Chemother**, v. 57, p. 908-913.

WANG, Y. B.; TIAN, Z. Q.; YAO, J. T.; LI, W. Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. **Aquaculture**, v. 277, p. 203-207, 2008.