

## MICROBIOTA BACTERIANA DO *Macrobrachium amazonicum* DO RIO SÃO FRANCISCO

[Bacterial microbiota of the *Macrobrachium amazonicum* from São Francisco river, Brazil]

Nara Patrícia Cavalcanti Andrade<sup>1</sup>, Francisco Messias Filho<sup>1</sup>, Manuel Valente Carrera<sup>1</sup>, Luciana Jatobá e Silva<sup>1</sup>, Isabelle Franco<sup>1</sup>, Mateus Matiuuzzi da Costa<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Mestrandos do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – Universidade Federal do Vale do São Francisco.

<sup>2</sup>Professor, Departamento de Zootecnia - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Rua Padre Albino nº 216, Caminho do Sol, Petrolina, PE 56300-000, Brasil.

**RESUMO** - O presente estudo teve por objetivo pesquisar a microbiota bacteriana do camarão-canela, espécie continental de freqüente ocorrência. Os camarões foram coletados nas margens do Rio São Francisco na cidade de Petrolina-PE e semeados em Tryptic Soy Agar (TSA) e Agar MacConkey (MC) e incubados a 27°C. A leitura das placas foi realizada em até 48h e os agentes bacterianos foram identificados. Foram encontrados 26 isolados entre eles: *Enterobacter* spp. (n=7), *klebsiella* spp. (n=4), *Staphylococcus* spp. (n=4), *Acinetobacter* spp. (n=3), 2 *Streptococcus* spp. (n=2), *Alcaligenes* spp. (n=2), *Shigella* spp. (n=1), *Escherichia coli* (n=1), *Enterococcus* spp. (n=1) e *Pseudomonas* spp. (n=1). A atividade antimicrobiana foi verificada pelo método de difusão em discos de Kirby-Bauer. Dos isolados 92,3% foram sensíveis a enrofloxacina ; 88,4% a tetraciclina ; 84,6% a ceftriaxona ; 84,6% foram sensíveis a sulfazotrim ; 76,9% a estreptomomicina ; 65,3% a gentamicina ; 57,6% ao ácido nalidíxico ; 57,6% a eritromicina ; 53,8% a ampicilina ; 50% a amoxicilina ; 46,1% a nitrofurantoína ; 42,3% a neomicina e 38,4% a lincomicina . Sendo a bactéria *Streptococcus* spp., em média, a mais sensível aos antimicrobianos e *Pseudomonas* spp. menos sensível. Este estudo demonstrou que podem ser encontradas bactérias com potencial patogênico para os seres humanos na espécie *M. amazonicum*.

**Palavras-Chave:** Antibióticos, bactérias e camarão.

**ABSTRACT** - The objective of the present study was to determine the bacterial microbiota of shrimp cinnamon, continental kind of frequent occurrence. The shrimps were collected on the banks of the Rio São Francisco in the city of Petrolina-PE and streaked in Tryptic Soy Agar (TSA) and MacConkey agar (MC) and incubated at 27°C. The reading of the plates was performed in up to 48 hours, and bacterial agents were identified. Twenty six 26 isolates were found being: *Enterobacter* spp. (n=7), *Klebsiella* spp. (n=4), *Staphylococcus* spp. (n=4), *Acinetobacter* spp. (n=3), *Streptococcus* spp. (n=2), *Alcaligenes* spp. (n=2), *Shigella* spp. (n=1), *Escherichia coli* (n=1), *Enterococcus* spp. (n=1), and *Pseudomonas* spp. (n=1). Antimicrobial activity was determined by the disk diffusion Kirby-Bauer test. Of the isolates 92.3% were sensible to enrofloxacin , 88.4% to tetracycline, 84.6% to ceftriaxone , 84.6% to sulfazotrim, 76.9% to streptomycin, 65.3% to gentamicin, 57.6% to nalidixic acid, 57.6% to erythromycin, 53.8% to ampicillin, 50% to amoxicillin, 46.1% to nitrofurantoin, 42.3% to neomycin and 38.4% to lincomycin. The more sensible bacterial genus was *Streptococcus* spp. and *Pseudomonas* spp. the least sensitive. This study showed that bacteria with pathogenic potential for man in specie *M. amazonicum*.

**Keywords:** Antibiotics, bacterials, shrimp.

### INTRODUÇÃO

Na família *Palaemonidae*, os camarões do gênero *Macrobrachium* caracterizam-se por uma ampla distribuição mundial nas águas doces e salobras. Muitas espécies apresentam um grande interesse comercial para aqüicultura, como é o caso do camarão exótico, o gigante da Malásia,

*Macrobrachium rosenbergii*, e dos camarões nativos *M. carcinus* e *M. acanthurus*. Magalhães & Walker (1988) separam as espécies de camarões continentais em dois grupos: os camarões tipicamente continentais com desenvolvimento larval abreviado e os camarões de ampla distribuição geográfica com desenvolvimento larval completo e muitos estágios larvais.

\* Autor para correspondência. E-mail: mateus.costa@univasf.edu.br.

A ocorrência do camarão canela, uma espécie continental de desenvolvimento larval completo, é registrada nas bacias do rio São Francisco, rio Orinoco, rio Amazonas, rio Paraguai e também na bacia Amazônica. O camarão canela, quando vivo, apresenta-se transparente e quase incolor. Esta espécie é caracterizado por um rostro longo, ultrapassando distintamente a extremidade do escafocerito, com a margem superior provida de 9 a 12 dentes irregularmente distribuído, com os 7 ou 8 dentes proximais formando uma crista basal sobre a órbita, tendo a margem inferior de 8 a 10 dentes. O telson termina por uma extremidade aguda com espinhos muito curtos (Houlthuis, 1952).

As enfermidades em organismos aquáticos representam um dos principais fatores de risco considerando para indústria aquícola no Brasil e no mundo. Em geral, o cultivo de camarões na América tem sofrido baixa devido às enfermidades de origem viral e bacteriana (Buglione et al., 2008). Na infraestrutura e nos serviços de saneamento básico na Região Nordeste e nos centros urbanos municipais localizados às margens dos rios, há fragilidades que contribuem para a constante poluição microbiológica da água dos estuários, afetando de maneira direta sua qualidade. O despejo de efluentes sanitários sem tratamento nos corpos aquáticos é o principal responsável pela contaminação desses ambientes. A carga microbiana muitas vezes excede a capacidade natural de diluição do ambiente aquático (Menezes et al., 2008).

A *Escherichia coli* e a *Enterobacter aerogenes* são bactérias do grupo coliformes, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, *E. coli* é indicadora de contaminação fecal e da má qualidade sanitária de água aparecendo associada à *Salmonella* e *Shigella* (Oetterer, 2002). O principal habitat da *Enterobacter* spp. é o ambiente aquático, incluindo a água doce e do mar, é comumente encontrada no intestino de peixes (Falcão et al., 2007). *Streptococcus* spp. é uma bactéria que ocasiona diversas enfermidades nos animais e seres humanos (Quinn et al., 2005). A estreptococose é uma doença septicêmica que afeta peixes de água doce em cultivo ou livres no meio ambiente (Evans et al., 2002). Sua patogenicidade está associada a condições de estresse, relacionadas à qualidade da água (Bunch & Bejerano, 1997).

A utilização de antimicrobianos para o controle de infecções tem tido um sucesso limitado na prevenção ou cura em ambientes aquáticos. O uso indiscriminado de antimicrobianos para o controle de doenças ou como promotores de crescimento, aumenta a pressão da seleção sobre os microrganismos, levando naturalmente ao aumento

da resistência bacteriana. Além da proliferação das bactérias resistentes após a morte das bactérias não resistentes ao antimicrobiano, há também a possibilidade da transferência dos genes de resistência a outras bactérias que nunca foram expostas a tal antimicrobiano (Verschuere et al., 2000).

Objetivou-se nesse trabalho pesquisar a microbiota bacteriana do camarão-canela (*Macrobrachium amazonicum*) da bacia do Rio São Francisco e sua sensibilidade frente a drogas antimicrobianas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta das amostras do camarão canela

Os camarões foram coletados nas margens do Rio São Francisco na cidade de Petrolina-PE e colocados em frascos estéreis, identificados e acondicionados sob refrigeração até sua chegada ao Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Fazenda de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Vale do São Francisco.

### Isolamento e identificação bacteriana

O conteúdo de cada um dos camarões foi obtido assepticamente, após desinfecção da superfície com etanol 70%, e submetido ao isolamento bacteriano. As amostras foram semeadas em Ágar TSA (Tryptic Soy Agar) e MC (Agar MacConkey), com o auxílio de uma alça de platina e incubadas em estufa a 27°C. A leitura das placas foi realizada após 48h de incubação e os grupos bacterianos foram identificados por meio de características morfológicas, bioquímicas e tintoriais (Quinn et al., 1994; Murray et al., 1995).

### Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

O perfil de sensibilidade dos microrganismos foi determinado através do método de difusão em disco Kirby-Bauer modificado (Bauer et al., 1966; NCCLS, 1997). Os isolados foram semeados em Müller Hinton caldo e incubados a 27°C até obtenção de turvação conforme a escala 0,5 de MacFarland. Com auxílio de um swab, os isolados foram semeados em placas de Petri contendo ágar Müller Hinton. Logo após, foram aplicados os discos impregnados com as drogas antimicrobianas: ceftriaxona (30mcg); ácido nalidíxico (30mcg); amoxicilina (10mcg); estreptomina (10mcg); eritromicina (15mcg); enrofloxacina (05mcg);

gentamicina (10mcg); tetraciclina (30mcg); ampicilina (10mcg); lincomicina (02mcg); nitrofurantoína (300mcg); sulfazotrim (25mcg) e neomicina (30mcg). As placas foram incubadas em estufa durante 24h a 27°C. Após a leitura dos halos foi determinado o perfil de sensibilidade dos isolados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

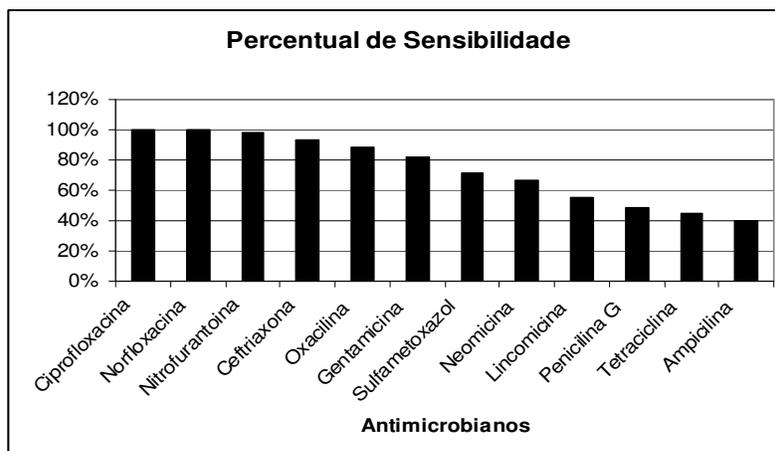
No total foram isoladas 26 bactérias entre elas: *Enterobacter* spp. (n=7), *Klebsiella* spp. (n=4), *Staphylococcus* spp. (n=4), *Acinetobacter* spp. (n=3), *Streptococcus* spp. (n=2), *Alcaligenes* spp. (n=2), *Escherichia coli* (n=1), *Shigella* spp. (n=1), *Enterococcus* spp. (n=1) e *Pseudomonas* spp. (n=1). Nesta pesquisa, observou-se o isolamento de microrganismos do gênero *Enterobacter*. *Salmonella* spp. e *Enterobacter* spp. são bactérias comumente encontradas em camarões, sendo estes partes da sua microbiota (Knoose et al., 2005). Em seu estudo, McDaniel (1979) encontrou essas bactérias em 2% dos animais avaliados, sendo que não foram encontrados outros relatos de doenças causadas por esse microrganismo em organismos aquáticos. A maioria das doenças gastrointestinais causadas por representantes da família *Enterobacteriaceae*, envolvem surtos pelo consumo de alimentos e água não tratada (Salerno et al., 2007), indicando seu impacto a saúde pública, especialmente em produtos não pasteurizados (Kim et al., 2008).

De acordo com Maeda (2002), as bactérias normalmente encontradas na aquicultura são pertencentes aos gêneros *Vibrio*, *Pseudomonas*,

*Flavobacterium*, *Pseudoalteromonas* e *Acinetobacter*. Em nosso estudo, foram encontrados *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas* spp. embora não seja considerada um importante patógeno em aquicultura, porém, tem sido descrita na contaminação de camarões e desenvolvimento de doenças nos seres humanos (Jeyasenkaran et al., 2005).

A flora bacteriana intestinal de organismos aquáticos, ao contrário de organismos terrestres, é constituída predominantemente por bactérias gram-negativas (Gomez-Gil et al., 2000). Isto pode alterar devido a transformações bruscas que ocorrem frente a mudanças no ambiente, escassez de alguns nutrientes ou pelo uso de bactérias probióticas (Ringo & Gatesoupe, 1998). Em nosso estudo, foram identificados espécies de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.. Microrganismos pertencentes a estes gêneros são descritos como patogênicos para peixes, embora a patogenicidade destes microrganismos tenha sido muitas vezes questionada (Shama et al., 2000).

Os perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos obtidos foram de 92,3% a enrofloxacina (05mcg), 88,4% a tetraciclina (30mcg), 84,6% a sulfazotrim (25mcg), 84,6% a ceftriaxona (30mcg), 76,9% a estreptomomicina (10mcg), 65,3% a gentamicina (10mcg), 57,6% ao ácido nalidíxico (30mcg), 57,6% a eritromicina (15mcg), 53,8% a ampicilina (10mcg), 50% a amoxicilina (10mcg), 46,1% a nitrofurantoína (300mcg), 42,3% a neomicina (30mcg) e 38,4% a lincomicina (02mcg) (Figura 1), sendo a bactéria *Streptococcus* spp. mais sensível aos antimicrobianos (96%) e *Pseudomonas* spp. obteve menor sensibilidade com 23%.



**Figura 1.** Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de bactérias isoladas de Camarões coletados no Rio São Francisco em outubro de 2008.

Os micro-organismos isolados dos camarões-canela demonstraram uma maior resistência aos antimicrobianos: neomicina, nitrofurantóina, lincomicina, amoxicilina e ampicilina, confrontando com Costa & Cyrino, (2006) que verificaram em isolados de tilápia e pacu, uniformemente resistência a amoxicilina, ampicilina, lincomicina, novobiocina, oxacilina, penicilina e trimetoprim+sulfametoxazol. Nesse trabalho a eritromicina obteve intermediária resistência corroborando com os mesmos autores, o isolado bacteriano de pacu foi a única linhagem resistente a tetraciclina, a qual não foi observada para maior parte dos isolados avaliados no presente estudo. Costa et al., (2008), estudando a susceptibilidade “in vitro” a antimicrobianos de estirpes de *Vibrio* spp. isoladas de camarões *Litopenaeus vannamei* e de água de criação destes animais, observaram a sensibilidade dos isolados a sulfazotrim, a ampicilina e a ceftriaxona.

Contudo a resistência aos antimicrobianos em organismos aquáticos é muito diversa e relacionada ao local de onde estas foram coletadas. Desta forma estudos sobre a resistência aos antimicrobianos de isolados de organismos aquáticos são fundamentais para guiar a terapia, mas especialmente para monitorar níveis de resistência no meio ambiente (Cabello, 2006; Smith et al., 2008). As diferenças observadas em nosso trabalho dos perfis de sensibilidade demonstram a importância da realização de testes para identificação do agente causal e da sua sensibilidade antimicrobiana.

## CONCLUSÕES

Diversas espécies de bactérias em camarões de água doce podem ser encontradas, prejudicando assim a saúde do consumidor, por isso, a necessidade de medidas profiláticas para evitar a contaminação por agentes patogênicos e uso indiscriminado de antibióticos. As drogas antimicrobianas com maior atividade contra os isolados bacterianos de camarões foram enrofloxacin, tetraciclina, sulfazotrim, ceftriaxona e estreptomina.

## REFERÊNCIAS

- Bauer A.W., Kirby W.M.M., Sherris J.C. & Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology, 45: 493-496.
- Buglione C. C., Pedrotti, F. & Vieira, F. N. 2008. Avaliação de bacteriana e *Lactobacillus plantarum* frente à infecção experimental por *Vibrio harveyi* em pós-larvas de *Litopenaeus vannamei*. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science. 45: 40-45.
- Bunch E. C. & Bejerano I. 1997. The effect of environmental factors on the susceptibility of hibrid tilapia *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus* to streptococcosis. Israeli Journal Aquaculture. 49 (2):67-76.
- Cabello F.C. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. Environmental Microbiology. 8 (7): 1137-44.
- Costa A. B. & Cyrino J. E. P. 2006. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from *piaractus mesopotamicus* (holmberg, 1887) and *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) Scientia Agricola 63 (3): 281-284.
- Costa R. A., Vieira G. H. F., Silva G. C., Vieira R. H. S. F. & Sampaio S. S. 2008. Susceptibilidade “in vitro” a antimicrobianos de estirpes de *Vibrio* spp isoladas de camarões (*Litopenaeus vannamei*) e de água de criação destes animais provenientes de uma fazenda de camarões no Ceará – Nota prévia Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science. 45 (6): 458-462.
- Evans J. J., Klesius P. H., Gilbert P.M., Shoemaker C. A., Sarawi M. A. Al., Landsberg J., Duremez R., Marzouk, A. Al. & Zenki, S. AL. 2002. Characterization of B-haemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. Journal Fish Diseases. 25: 505-513.
- Falcão J. P., Gibotti A. A., Souza R.A., Campioni F. & Falcão, D. P. 2007. *Plesiomonas shigelloides*: um enteropatógeno emergente? Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. 28: 141-151.
- Gomez-Gil B., Roque A. & Turnbull J. F. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. Aquaculture. 191 (1-3): 259-270.
- Holthuis L.B. 1952. A general revision of the *Palaemonidae* (Crustacea, Decapoda, Natantia) of the Americas. II. The subfamily *Palaemoninae*. OCC. Pap. Allan.12: 396.
- Jeyasekaran G. J., Ganesan P., Anandaraj, R., Jeya Shakila R & Sukumar D. 2006. Quantitative and qualitative studies on the bacteriological quality of Indian white shrimp (*Penaeus indicus*) stored in dry ice. Food Microbiology. 23: 526-533.
- Kim K., Jang S., Kim S. K., Park J., Heu S. & Ryu S. 2008. Prevalence and genetic diversity of *Enterobacter sakazakii* in ingredients of infant foods. Int J Food Microbiol. 29 (1-2):196-203.
- Koonse B., Burkhardt W., Chirtel S. & Hoskin G. 2005. *Salmonella* and the sanitary quality of aquacultured shrimp. Journal of food protection. 68 (12): 2527-2532.
- Maeda, M. 2002. Microbial communities and their use in aquaculture. Microbial approaches to aquatic nutrition within environmentally sound aquaculture production systems. World Aquaculture Society. 1: 187.
- Magalhães C. & Walker I. 1988. Larval development and ecological distribution of central amazonian Palaemonid shrimps (*Decapoda, Caridae*). Crustaceana. 55 (3): 279-292.
- McDaniel D. 1979. Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens. American fisheries society: fish health section. p. 118.
- Menezes F.G.R., Carvalho F.C.T. & Lima A.S. Pesquisa de *Salmonella* na água, solo e camarão (*Litopenaeus vannamei*) de

