





**INSTITUTO SUPERIOR POLITÉCNICO DE GAZA  
FACULDADE DE AGRICULTURA  
CURSO DE ENGENHARIA DE AQUACULTURA**

**Nível:4º**

**Monografia Científica**

**Monografia submetida como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de licenciatura em Engenharia de Aquacultura, sobre o tema:**

**Análise Microbiológica da Água e da Tilápia Nilótica (*Oreochromis niloticus*) Cultivada nos Tanques Piscícolas do ISPG-Chókwè**

**Autora:** Tarcísia Stela Carlos Simione

**Tutor:** Eng. Orbino Guambe, Msc

Lionde, Outubro de 2019



## INSTITUTO SUPERIOR POLITÉCNICO DE GAZA

Simione, Tarcísia Stela Carlos. “Análise Microbiológica da Água e da Tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) Cultivada nos Tanques Piscícolas do ISPG”, monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Aquacultura na Faculdade de Agricultura do Instituto Superior Politécnico de Gaza, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de licenciatura em Engenharia de Aquacultura.

Monografia defendida e aprovada em 14 de Agosto de 2019

### Júri

Supervisor

---

(Eng. Orbino Alberto Guambe, Msc)

Avaliador

---

(dra. Madalena João Capassura, Msc)

Avaliador

---

(Eng. Mikosa Nkole, Msc)



## **DECLARAÇÃO**

Declaro por minha honra que esta Monografia Científica é resultado da minha investigação pessoal e das orientações do meu tutor, o seu conteúdo é original e todas as fontes consultadas estão devidamente mencionadas no texto, nas notas e na bibliografia final. Declaro ainda que este trabalho não foi apresentado em nenhuma outra instituição para propósito semelhante ou obtenção de qualquer grau académico.

Lionde, \_\_\_\_\_ de Outubro de 2019

---

(Tarcísia Stela Carlos Simione)

<b>Índice</b>	<b>Pág</b>
DECLARAÇÃO .....	iv
DEDICATÓRIA .....	x
AGRADECIMENTOS .....	xi
RESUMO .....	xii
ABSTRACT .....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Objectivos.....	2
1.1.1. Geral:.....	2
1.1.2. Específicos:.....	2
1.2. Problema de estudo e Justificativa .....	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
2.1. Caracterização da espécie.....	4
2.2. Classificação Taxonómica da Tilápia Nilótica.....	5
2.3. Bactérias que afectam tilápias em sistemas de cultivo.....	5
2.3.1. <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	5
2.3.2. <i>Flavobacterium columnare</i> .....	6
2.3.3. Coliformes.....	6
2.3.4. <i>Salmonella</i> .....	7
2.3.5. <i>Streptococcus spp.</i> .....	8
2.3.6. <i>Pseudomonas spp.</i> .....	8
2.4. PARÂMETROS DE QUALIDADE DE ÁGUA .....	9
2.4.1. Parâmetros físicos-químicos da água.....	9
2.4.2. Parâmetros microbiológicos.....	12
2.5. Procedimento Analíticos para Avaliação de bactérias em Peixes.....	12

2.5.1.	Caracterização da qualidade ambiental e da água.....	12
2.5.2.	Amostragens de peixes e colecta de amostras biológicas.....	12
2.6.	Meios de Cultura das bactérias.....	13
2.6.1.	Cultivo de <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	13
2.6.2.	Cultivo de <i>Flavobacterium columnare</i> .....	13
2.6.3.	Cultivo de <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	13
2.6.4.	Coliformes totais em meio VRBA.....	14
2.6.5.	Meio de cultura TBX.....	14
2.6.6.	Identificação molecular das bactérias.....	14
3.	METODOLOGIA.....	15
3.1.	Materiais.....	15
3.1.1.	Materiais para as análises da água.....	15
3.1.2.	Materiais e equipamentos para análises microbiológicas dos peixes.....	15
3.2.	Metodos.....	17
3.2.1.	Caracterização do local em estudo.....	17
3.2.2.	Clima.....	18
3.2.3.	Hidrografia.....	18
3.3.	Trabalho de campo.....	18
3.3.1.	Análise dos parâmetros químicos da água.....	19
3.3.2.	Parâmetros microbiológicos da água.....	20
3.3.3.	Análise microbiológica dos peixes.....	21
3.3.3.2.	Pesquisa de <i>Aeromonas</i> spp.....	21
3.3.3.3.	Pesquisa de <i>Pseudomonas</i> spp.....	21
3.3.3.4.	Pesquisa de <i>Escherichia coli</i> .....	21
3.3.3.5.	Pesquisa de microrganismos viáveis a 37°C (Aeróbios totais).....	22

3.3.4. Determinação da taxa de prevalência das bactérias .....	22
4. RESULTADOS .....	23
4.1. Amostras de peixe .....	23
4.2. Amostras de água .....	23
5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS .....	26
6. CONCLUSÃO.....	28
7. RECOMENDAÇÕES.....	29
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	30
9. APÊNDICES .....	35

## **Índice de tabelas e Figuras**

Tabela 1: Resultados das análises microbiológicas de peixes.....	23
Tabela 2: Resultados dos parâmetros físicos-químicos da água.....	24
Tabela 3: Resultados dos parâmetros microbiológicos da água.....	24
Tabela 4: Resultados da taxa de prevalência, abundância média, intensidade e dominância...	25
Figura 1: Mapa do distrito de chókweè .....	17
Figura 2: Fluxograma da análise de dureza.....	18
Figura 3: Fluxograma da análise de cloretos.....	19
Figura 4: Gráfico da variação dos índices de cada parasita no peixe cultivado.....	25



## **I. LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>pH</b>	Potencial de hidrogénio
<b>MAE</b>	Ministério da Administração Estatal
<b>°C</b>	Graus celsius
<b>ISPG</b>	Instituto Superior Politécnico de Gaza
<b>MPA</b>	Ministério da Pesca e Aquicultura
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>%</b>	Percentagem
<b>mL</b>	Miligramas por litro
<b>TSB</b>	Tryptone Soy Broth
<b>TSA</b>	tryptone soy Agar
<b>BHI</b>	brain heart Infusion
<b>N2</b>	nitrogénio
<b>NO2</b>	óxido nitroso
<b>NH3</b>	amonia
<b>LNHAA</b>	Laboratório Nacional de Higiene de água e alimento
<b>TBX</b>	Trytone-bile-glucuronic medium
<b>PCA</b>	Plate Count Agar
<b>VRBA</b>	Violet-red Bile Agar

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho aos meus pais Carlos Artur Simione e Linda Petasse Cossa Simione, com todo o meu amor e admiração. Por tudo o que me ensinaram, por serem minha luz e meu porto-seguro e por estarem sempre presente em todos momentos da minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, pelo dom da vida, pela saúde, por me fortalecer em todos os momentos e por me guiar pelos melhores caminhos da vida.*

*Aos meus pais, Carlos Artur Simione e Linda Petasse Cossa Simione, por todo apoio oferecido durante a minha formação, por abrirem mão de muitos dos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Vocês estão presentes em todos momentos da minha vida. Retribuir tudo o que tem feito por mim seria impossível, espero ainda conseguir dar muito orgulho a vocês.*

*Ao meu tutor, Eng. Orbino Guambe Msc., pelos ensinamentos, orientações, oportunidade e pela confiança em mim depositada desde o início. A quem tenho muito respeito e admiração. Muito obrigada por tudo!*

*À minha co-tutora, Dra. Isabel Tauzene, por quem tenho grande admiração. Obrigada por me receber no Laboratório Nacional de Higiene Águas e Alimentos (LNHAA), por tudo o que me ensinou, não só em microbiologia, mas em vários outros aspectos, por toda a ajuda e por confiar no meu trabalho.*

*Ao Instituto Superior Politécnico de Gaza, Aos docentes que leccionam no curso de Engenharia de Aquacultura, pelos ensinamentos, convivência, e alegria compartilhada durante o curso, aos meus colegas, pela convivência, pela troca de conhecimento, por tudo que compartilhamos durante todo curso.*

*Às minhas irmãs Orcídia Carlos Simione e Ana Gabriela Simione, pelo apoio incondicional e por sempre me desejarem o melhor. Obrigada pela amizade, pelo amor, protecção, diversão e por estarem sempre do meu lado.*

*Aos meus amigos, José Machava Júnior (em memória), Fátima Issufo Ismael e Delfina Justino Júnior, por todos momentos compartilhados durante o curso.*

*Ao Sr. Naimo Ragu, por me receber em sua casa e me fazer sentir-se em casa, pelos puxões de orelhas fizeste o papel de segundo pai e a família do condomínio do Sr. Naimo pela alegria e por todos os momentos compartilhados.*

*A toda família e a todos que contribuíram para que eu cumprisse esta etapa.*

## RESUMO

As bactérias constituem importantes patógenos na piscicultura intensiva e semi-intensiva, devido a sua facilidade de disseminação e podem ocasionar impactos económicos consideráveis devido às doenças que provocam. No sistema de cultivo semi-intensivo, os peixes são extremamente dependentes das condições ambientais para sua sobrevivência, pois o ambiente aquático não é constante e sofre influência direta da temperatura, do oxigénio dissolvido e presença de substâncias tóxicas na água. Estes transtornos debilitam os peixes, tornando-os susceptíveis a vários tipos de patógenos. Desta forma, o presente trabalho teve como objectivo analisar a microbiologia da água e da Tilápia nilótica (*Oreochromis Niloticus*) cultivada nos tanques piscícolas do ISPG. O estudo realizou-se em 2 meses, nos tanques piscícolas e no Laboratório Nacional de Higiene Águas e Alimentos (LNHAA), coletou-se um total de 30 exemplares de peixes, para às análises microbiológicas. Durante o estudo analisou-se parâmetros físicos da água como a temperatura com auxílio de um termómetro e a transparência com o auxílio do disco de SECCHI. Também coletou-se 3 amostra de 200 ml de água para análises microbiológicas e 1.5L da mesma para as análises químicas. Após a colecta do peixe realizou-se um exame macroscópico externo nos peixes, para a observação de qualquer sinal clínico que pudesse indicar a presença de bactérias. Após o exame macroscópico, os peixes foram empacotados em sacos plásticos e mantidos sob refrigeração em caixa isotérmica com gelo e transportados até o LNHAA para a devida triagem. O material colectado foi semeado em meios de cultura TBX, VRBA, PCA, MRLS e BHI para a análise das bactérias de interesse, sendo incubado a uma temperatura de 30 °C-44°C durante um período de 24 a 48 horas. Após o período de incubação, procedeu-se com caracterização e contagem das unidades formadoras de colónias. No presente estudo identificou-se bactérias do género *Aeromonas*  $2 \times 10^2$ , *Pseudomonas*  $1 \times 10^2$ , *Microorganismos viáveis a 37°C*  $5.3 \times 10^3$  e *E. Coli*  $4.0 \times 10^2$  no músculo da tilápia nilótica e bactérias do género coliformes e *E. Coli* ( $>100$ ) na água de cultivo. Não obstante, concluiu-se que as bactérias do género *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Microorganismos viáveis a 37°C* e *E. Coli* no músculo da tilápia nilótica e bactérias do género coliformes e *E. Coli* na água de cultivo estão em níveis significativos. Estes níveis encontrados podem ocasionar vários tipos de doença como a Septicemia hemorrágica nos peixes cultivados e conseqüentemente causar impactos económicos consideráveis na produção comercial nos peixes cultivados nesta unidade de produção. Os parâmetros físicos-químicos de qualidade de água influenciaram na ocorrência de microorganismos patogénicos nesta unidade de produção.

**Palavras-chave:** Bactérias, microbiologia, qualidade de água, tilápia do nilo.

## ABSTRACT

Bacteria are important pathogens in intensive and semi-intensive fish farming because of their ease of spread and can have considerable economic impacts due to the diseases they cause. In the semi-intensive farming system, fish are extremely dependent on environmental conditions for their survival, as the aquatic environment is not constant and is directly influenced by temperature, dissolved oxygen and the presence of toxic substances in water. These disorders weaken fish, making them susceptible to various types of pathogens. Thus, the present work aimed to analyze the microbiology of water and Nilotic Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) grown in ISPG fish ponds. The study was conducted in 2 months, in fish ponds and the National Laboratory of Hygiene Water and Food (LNHAA), collected a total of 30 specimens of fish, for microbiological analysis. During the study physical parameters of water were analyzed such as temperature with the aid of a thermometer and transparency with the aid of the SECCHI disc. Three samples of 200 ml of water were also collected for microbiological analysis and 1.5L of it for chemical analysis. After fish collection, an external macroscopic examination was performed on the fish to observe any clinical signs that might indicate the presence of bacteria. After macroscopic examination, the fish were packaged in plastic bags and refrigerated in an isothermal ice box and transported to the LNHAA for proper screening. The collected material was seeded in TBX, VRBA, PCA, MRLS and BHI culture media for the analysis of the bacteria of interest and incubated at 30-44 ° C for a period of 24-48 hours. After the incubation period, characterization and counting of colony forming units was performed. In the present study we identified bacteria of the genus *Aeromonas*  $2 \times 10^2$ , *Pseudomonas*  $1 \times 10^2$ , Viable microorganisms at 37 ° C  $5.3 \times 10^3$  and *E. Coli*  $4.0 \times 10^2$  in Nilotic tilapia muscle and coliform bacteria and *E. coli* ( $> 100$ ) in cultivation water. Nevertheless, it was concluded that the bacteria of the genus *Aeromonas*, *Pseudomonas*, Viable microorganisms viable at 37 ° C and *E. coli* in the Nilotic tilapia muscle and coliform bacteria and *E. coli* in cultured water are at significant levels. These levels can cause various types of diseases such as hemorrhagic septicemia in farmed fish and consequently have considerable economic impacts on commercial production in farmed fish in this production unit. The physicochemical parameters of water quality influenced the occurrence of pathogenic microorganisms in this production unit.

**Key words:** Bacteria, microbiology, water quality, Nile tilapia.

## 1. INTRODUÇÃO

Aquacultura é a produção de organismos aquáticos em qualquer fase de desenvolvimento em cativeiro, que compreende peixes, crustáceos, moluscos, quelônios e anfíbios (Oliveira 2009).

A aquacultura pode também ser definida como a actividade que se dedica ao cultivo de organismos aquáticos com valor económico a fim de assegurar a segurança alimentar no mundo por meio da distribuição democrática do alimento em todas as camadas sócio económica do mundo sem deprestar o meio ambiente (FAO 2008).

A piscicultura é o sector mais popular da aquacultura e está em constante crescimento devido ao aumento na demanda por peixes. O peixe está entre os tipos de pescado mais consumidos no mundo (MPA 2010).

Existem diversos sistemas de produção de peixes classificados segundo diferentes critérios. A classificação mais utilizada é segundo a produtividade e os sistemas podem ser extensivos, semi-intensivos e intensivos (Cyrino 2004 e Kubitzka 2006).

A prática da piscicultura permite uma elevada produção de peixe em pouco espaço e a baixo custo. Para alcançar um bom rendimento o piscicultor deve estar atento ao estado sanitário dos peixes e tomar medidas profiláticas no intuito de evitar a ocorrência de doenças. As infecções massivas por microrganismos podem resultar em elevada mortalidade, redução de crescimento e perda do valor comercial dos peixes, acarretando desta forma prejuízos económicos elevados para o piscicultor (Piasecki *et al* 2004).

Os peixes são extremamente dependentes das condições ambientais para sua sobrevivência, pois o ambiente aquático não é constante e sofre influência direta da temperatura, do oxigênio dissolvido e presença de substâncias tóxicas na água. Estes transtornos debilitam os peixes, tornando-os susceptíveis á vários tipos de doenças infecto-contagiosas ou não (Moreira *et al* 2001).

As condições ambientais são factores limitantes para o sucesso na criação de peixes, exigindo assim a implantação de práticas de manejo que se não forem adequadas, predispõem os peixes aos agentes bacterianos presentes no ambiente (Moreira *et al* 2001).

As bactérias constituem importantes patógenos na piscicultura intensiva e semi-intensiva, devido a sua facilidade de disseminação e por apresentarem um carácter oportunista (Kubitza 2000 & Pavanelli *et al* 2008).

Bactérias oportunistas podem tornar-se patogênicas em casos de estresse e levar os peixes à mortalidade (Shama *et al* 2000).

Existem inúmeras bactérias patogênicas, algumas delas ocorrem com frequência e apresentam maior impacto económico na produção comercial de peixes cultivados, são bactérias como: *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptococcus* spp. e *Flavobacterium columnare* (Kubitza 2004 ).

Outro grupo de microrganismos indicadores da qualidade da água são os aeróbios mesófilos heterotróficos, conhecidos como aeróbios totais. A contagem de aeróbios totais pode ser utilizada no monitoramento operacional como um indicador de tratamento, desinfecção e qualidade microbiológica da água, visto que sua ocorrência em grandes quantidades está ligada ao não tratamento ou tratamento inadequado da água e também a ambientes eutrofizados (Silva 2005). O presente trabalho teve como objectivo analisar a microbiologia da Tilápia do Nilo (*Oreochromis Niloticus*) cultivada nos tanques piscícolas do ISPG.

## **1.1.Objectivos**

### **1.1.1. Geral:**

- ♣ Analisar a microbiologia da água e da Tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) cultivada nos tanques piscícolas do ISPG.

### **1.1.2. Específicos:**

- ♣ Isolar as bactérias presentes na água de cultivo e na tilápia nilótica cultivada nos tanques piscícolas do ISPG;
- ♣ Identificar as bactérias presentes na água de cultivo e na tilápia nilótica cultivada nos tanques piscícolas do ISPG;
- ♣ Determinar a taxa de prevalência das bactérias em tilápia do Nilo;

### 1.2. Problema de estudo e Justificativa

O aumento significativo das actividades relacionadas à aquacultura no mundo tem aumentado consideravelmente a relevância de estudos desenvolvidos com bactérias e outros patógenos de organismos aquáticos, principalmente dos hospedeiros com potencial para o cultivo e para a comercialização de tilápias (Thatcher & Brites-Neto, 1994). Desta forma, nos sistemas de produção intensiva e semi-intensiva de peixes, a sanidade é um dos aspectos mais relevantes para a criação de qualquer espécie de peixe.

Nos tanques de piscicultura, existe um equilíbrio entre patógenos-hospedeiro-ambiente que, por algum motivo, como queda na qualidade da água, alterações bruscas de temperatura, diminuição no teor de oxigênio dissolvido, alta densidade de peixes, manejo inadequado ou alimentação carente em algum nutriente, favorecerão a queda na resistência dos peixes dando origem à mortalidade e proliferação de patógenos. Todos estes factores são responsáveis por causar estresse no organismo e com isso, o animal deixa de se alimentar como de costume tornando-se suscetível à infecções bacterianas, fúngicas e parasitárias. Muitos microrganismos podem estar normalmente presentes na superfície do corpo ou outros órgãos dos peixes (Pavanelli et al.2008), e sob àquelas condições inadequadas, dar início à doença.

Nos tanques piscícolas do ISPG tem-se registado alguns índices de mortalidade e sinais clínicos nos peixes cultivados que podem indicar a presença de organismos patogénicos. A presença de bactérias neste sistema de cultivo pode ocasionar impactos económicos consideráveis devido às doenças que provocam.

A análise microbiológica da tilápia nilótica cultivada nos tanques piscícolas do ISPG pode ajudar no desenvolvimento de técnicas profiláticas e melhorar o controlo das enfermidades e na planificação de actividades de manejo sanitário dos peixes, com vista a garantir uma melhor produção e evitar perdas no cultivo de tilápia nesta unidade de produção.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Segundo a FAO (2010), a aquacultura mundial apresenta uma taxa média de crescimento de 17% ao ano. O peixe é considerado um alimento nobre e de grande preferência em várias culturas, além de ser uma excelente fonte de proteína animal e de outros nutrientes essenciais contribuindo para a segurança alimentar em numerosas regiões. Em 2006, mais de 75% da produção mundial de peixe foi consumida, sendo 16,7 kg/pessoa e até 2030 este consumo deve aumentar para 20 kg/pessoa/ano. Os restantes 25% são na sua maior parte processados para farinha e óleo de peixe (Kubitza, 2003).

### 2.1. Caracterização da espécie

Tilápia é a denominação comum de grande número de espécies de peixes ciclídeos, contando com cerca de 22 espécies cultivadas no mundo. É considerada o peixe mais popular, sendo cultivada em mais de cem países. Entretanto, de todas as espécies vulgarmente chamadas de tilápias, as mais importantes comercialmente pertencem ao gênero *Oreochromis* (Miranda *et al* 2010).

A tilápia nilótica é de origem Africana, ela tem esse nome por ser originária do Rio Nilo, o maior rio da África, é fácil de diferenciar a tilápia nilótica com outras espécies de tilápia através das suas características, a nadadeira da cauda possui listras escuras verticais, o peixe tem cor cinza azulada, o corpo é curto, a cabeça e a cauda são pequenas (Arana 2004).

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) destaca-se como peixe com potencial para aquacultura, devido a sua rusticidade, crescimento rápido e adaptação ao confinamento, possui hábito alimentar onívoro, e aceita rações com grande facilidade, desde o período de pós-larva até a fase final do cultivo (Moreira *et al* 2001).

A tilápia é, entre as espécies de peixes mais cultivadas, que melhor resiste à alta temperatura, baixa concentração de oxigênio dissolvido e alta concentração de amônia na água (Meurer *et al* 2002). Outras características como crescimento rápido, resistência a doenças e ciclo curto de produção contribuem para o sucesso dessa espécie na aquacultura (Kubitza 2005).

As características relativas à carne da tilápia também são importantes para a frequência de sua produção, como o elevado valor nutricional, baixos teores de gordura, excelente textura e paladar. Por não apresentar micro-espinhas, possibilita a filetagem e a industrialização da

carcaça. Assim, por ser uma carne de ótima qualidade, é bastante apreciada pelo mercado consumidor (Boscolo *et al* 2004).

## 2.2. Classificação Taxonômica da Tilápia Nilótica

Classificação taxonômica da tilápia nilótica de acordo com (Linneaus, 1757 citado por Lizama 2007):

- ♣ Reino: *Animalia*
- ♣ Filo: *Chordata*
- ♣ Classe: *Actinopterygii*
- ♣ Ordem: *Perciformes*
- ♣ Família: *Cichlidae*
- ♣ Subfamília: *Pseudocrenilabrinae*
- ♣ Género: *Oreochromis*
- ♣ Espécie: *Oreochromis Niloticus*

## 2.3. Bactérias que afectam tilápias em sistemas de cultivo

### 2.3.1. *Aeromonas hydrophila*

É um coco bacilo gram-negativas, anaeróbias facultativas, não formadoras de esporos (Rodrigues *et al* 2007). *Aeromonas* é um *hydrophila* móvel que possui um único flagelo polar, catálase e oxidase positiva (Cipriano 2001).

Não é tolerante ao sal e ao ambiente ácido (pH min. 6,0), possui crescimento máximo a cerca de 28°C. Tem a capacidade para crescer a temperaturas frias tendo sido relatado casos -0,1°C para algumas espécies (Rodrigues *et al* 2007).

Segundo Palumbo *et al* (2001) nos peixes cultivados, a infecção por *A. hydrophila* normalmente causa hemorragia cutânea no corpo e nas nadadeiras, progredindo para ulcerações com perdas de epitélio, os peixes afetados normalmente morrem entre 02 e 10 dias após o início dos sinais clínicos.

A doença é transmitida horizontalmente a partir das excretas dos peixes ou lesões da pele. O habitat da *A. hydrophila* é na água e no trato gastrointestinal dos animais aquáticos e terrestres.

No entanto, as condições ambientais, tais como mudanças bruscas de temperatura, manipulação de alimentos, superlotação inadequada e redução na taxa de oxigênio, são factores que predisõem o início dos processos patológicos em peixes (Rodrigues *et al* 2007).

As bactérias do gênero *Aeromonas* também podem causar doenças em humanos (Murray et al 2009). As formas móveis de *Aeromonas* estão relacionadas principalmente á diarreias. As infecções gastrintestinais são a forma mais comum de manifestação clínica, espécies de *Aeromonas* são agentes etiológicos de uma variedade de doenças em humanos (Silva 2007). As infecções de feridas são a segunda fonte mais comum de isolados de *Aeromonas*, podendo causar doenças mais complexas nos músculos, nas articulações e nos ossos (Janda & Abbott 2010).

### 2.3.2. *Flavobacterium columnare*

*Flavobacterium columnare* é o agente etiológico da columnariose, enfermidade comumente observada em pisciculturas de água doce, que ocasiona extensiva morbidade e mortalidade em peixes de todo o mundo, gerando sérios impactos econômicos (Pilarski *et al.*, 2008).

*F. columnare* é uma bactéria gram-negativa, não flagelada, que tem como principal característica a motilidade, através de deslocamento e deslizamento em superfícies sólidas (Sebastião *et al.*, 2011).

A doença columnariose é caracterizada por aparecimento de pontos cinzentos ou áreas amareladas de erosão, que são normalmente cercadas por uma zona hiperémicas avermelhada geralmente aparecendo na cabeça, na superfície do corpo e nas brânquias (Pilarski *et al.*, 2008).

No entanto, sob condições desfavoráveis, tais como temperaturas inferiores a 20°C, baixos níveis de oxigênio dissolvido na água, altas concentrações de amônia, alta densidade de estocagem, associadas a outras bactérias, são capazes de invadir o corpo do hospedeiro causando danos ou até a morte em casos mais graves (Sebastião *et al.*, 2011).

### 2.3.3. Coliformes

Enterobacteriaceae é uma família heterogênea de bactérias Gram-negativas, sendo o grupo dos coliformes seu principal representante, o qual pode fazer parte da microbiota intestinal normal de humanos e animais, mas também do solo, água e vegetação, além de outros associados em vários processos patogênicos. Podem ser móveis com flagelos peritricos ou imóveis; têm distribuição ubiqüitária; não formam esporos; são aeróbios ou anaeróbios facultativos; fermentam a glicose;

alguns fermentam a lactose; reduzem os nitritos a nitratos; são oxidase negativa e catalase positivos (Okura e Siqueira 2005).

A classificação dos coliformes segundo Silva (1997) apresenta o grupo de coliformes totais que inclui as bactérias na forma de bastonetes Gram-negativos, não esporogênicos, aeróbios ou aeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35 °C. Apresenta-se cerca de 20 espécies, dentre as quais encontram-se bactérias originárias do trato intestinal de humanos e outros animais de sangue quente.

Os alimentos e a água podem servir como veículos de agentes patogênicos ao homem. Microorganismos indicadores, como os coliformes termotolerantes, são usados para monitorar a sua qualidade microbiológica, classificando e restringindo seu uso (Möllerke *et al* 2002).

#### 2.3.4. *Salmonella*

As bactérias do gênero *Salmonella* pertencem à família Enterobacteriaceae. São bacilos Gram-negativos, não esporulados, anaeróbios facultativos, oxidase negativa e catalase positiva. A maioria é móvel devido à presença de flagelos peritríqueos, com exceção de *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*, que são imóveis (Vissoni 2003).

A *Salmonella* apresenta adaptação fisiológica muito grande, como é evidenciado pelo crescimento entre pH de 4,5 a 9,5 e temperaturas que variam de 5 a 47°C, sendo sua temperatura ideal de crescimento é entre 35 e 37°C (Franco e Landgraf, 2003).

De acordo com Jay *et al* (2005) e Juneja & Soffos (2010) as doenças causadas por *Salmonella* podem ser subdivididas em três grupos:

- ♣ **Febre tifoide:** doença bacteriana aguda, de gravidade variável, causada por *S. Typhi*, sendo transmitida por água e alimentos contaminados. Os sintomas aparecem normalmente até 14 dias após a ingestão dos patógenos e são caracterizados por septicemia, febre alta, convulsões, diarreia, vômitos, letargia, dor abdominal, cefaleia e erupções cutâneas

- ♣ **Febre paratifoide:** causada por *Salmonella* Paratyphi A e C. A doença é semelhante à febre tifoide, porém com sintomas mais brandos. Ocorre geralmente um quadro de septicemia, febre, vômitos e diarreia, com duração máxima de três semanas.

- ♣ **Salmonelose** (gastrenterite ou enterocolite): representa a forma clínica mais comum

e tem como agentes etiológicos os sorovares não tifoides, como *S. Enteritidis*. Os sintomas aparecem de 12 a 36 horas após o consumo de alimentos contaminados e caracterizam-se por febre, cefaleia, calafrios, dor abdominal, diarreia, náuseas e vômito.

### **2.3.5. *Streptococcus spp.***

*Streptococcosis* é uma das infecções bacterianas mais importantes que afectam tilápias. Normalmente tilápias infectadas com *streptococcosis* mostram diferentes manifestações clínicas, dependendo das espécies de *Streptococcus* e da espécie de tilápia (Kubitza 2000).

Sinais clínicos típicos podem incluir anorexia, letargia, melanose da pele, hemorragias petequiais e hiperemia da região anal, lesões hemorrágicas e necróticas na pele e tecido muscular, exoftalmia unilateral ou bilateral com ou sem sangramento e opacidade da córnea, uma das características importantes é a presença de movimentos erráticos e natação desorientada, principalmente quando peixe está morrendo, o que tem dado origem ao termo "doença de tilápia selvagem." O comportamento de natação anormal é causado pela meningoencefalite, que é a infecção das meninges por *Streptococcus* cérebro invasivo (Kubitza 2000).

### **2.3.6. *Pseudomonas spp.***

*Pseudomonas* são bacilos Gram negativos, aeróbicos, móveis, catalase positivos, amplamente distribuídos na natureza e particularmente abundantes no solo e água, sendo algumas vezes capazes de colonizar e causar doença em plantas e animais. Classificados como patógenos oportunistas devido às mínimas necessidades nutricionais, podem também apresentar capacidade de resistência a uma ampla variedade de condições físicas, como por exemplo, capacidade de adaptação e multiplicação sob refrigeração (Pirnay *et al* 2005).

Bactérias do gênero *Pseudomonas* também são patógenos oportunistas de peixes. São bastonetes Gram negativos, não fermentadores, usualmente móveis, retos ou ligeiramente curvos (Murray *et al* 2009).

As espécies de *Pseudomonas* estão presentes em praticamente todos os ambientes de água doce e se manifestam quando os peixes estão debilitados, principalmente por problemas de qualidade da água, como excesso de matéria orgânica, temperaturas extremas ou manuseio inadequado (Kubitza 2005 & Lima 2007).

As espécies de *Pseudomonas* causam um quadro de septicemia hemorrágica nos peixes que, clinicamente, não se distingue da causada por *Aeromonas* (Nunes 2007).

Geralmente há perdas de escamas e surgem manchas despigmentadas na pele, que podem evoluir para ulcerações.

As espécies de *Pseudomonas* mais frequentes em peixes não são patógenos importantes para humanos, embora possam causar doenças em imunocomprometidos (Figueiredo & Leal 2008).

## **2.4. PARÂMETROS DE QUALIDADE DE ÁGUA**

### **2.4.1. Parâmetros físicos-químicos da água**

Qualidade da água em aquacultura é o conjunto de características ótimas que devem ser mantidas no ambiente para garantir o melhor desenvolvimento e sanidade dos animais cultivados. O equilíbrio dinâmico de todas as variáveis físicas, químicas, biológicas e tecnológicas promove o cultivo sustentável, atendendo aos objetivos sociais, ambientais e econômicos. Um dos fatores mais importantes para o sucesso do cultivo de organismos aquáticos é a qualidade da água determinada por parâmetros físicos, químicos e biológicos (Arana 2004).

Na aquacultura, a má qualidade da água se deve à eutrofização, resultante da introdução de grande quantidade de matéria orgânica, proveniente dos restos de alimentos, dos adubos e das fezes dos animais cultivados (Tavares 2000).

Em sistemas de cultivo de peixes, os principais parâmetros da água a serem monitorados são: temperatura, oxigênio dissolvido (OD), pH, CO<sub>2</sub>, alcalinidade, dureza, condutividade elétrica, transparência, nutrientes e quantidade de plâncton (Pádua 2001 & Arana 2004).

#### **2.4.1.1. Temperatura**

A temperatura é um parâmetro físico de grande importância, pois afeta o desenvolvimento dos organismos aquáticos e exerce forte influência sobre outros parâmetros da água (Kubitza 2003 & Arana 2004).

Tilápias são peixes tropicais que apresentam conforto térmico entre 27 e 32° C. Temperaturas acima de 32° C e abaixo de 27° C reduzem o apetite e o crescimento. Abaixo de 20° C, o apetite fica extremamente reduzido e aumentam os riscos de doença. Com temperaturas de água abaixo de 18° C, o sistema imunológico das tilápias é suprimido. Assim, o manejo e o transporte destes peixes nos meses de inverno e início de primavera, invariavelmente resultam em grande mortalidade devido a infecções bacterianas e fúngicas. Tilápias bem nutridas e que não sofreram

estresse por má qualidade da água toleram melhor o manejo. Temperaturas na faixa de 8 a 14° C e acima de 38°C geralmente são letais por estresse térmico (Kubitza 2000).

#### **2.4.1.2. Transparência**

A Transparência é a capacidade que a água tem de permitir a passagem dos raios solares. A Transparência diminui em função da profundidade e da Turbidez, quanto mais fundo o tanque, menos luz consegue chegar até o fundo. É medida pelo disco de Secchi. A transparência da água maior que 30 cm indica baixa produtividade de plâncton, devendo-se realizar, então, a adubação.

Se for menor que 20 cm, indica alta produtividade de plâncton, devendo-se, então, cessar a adubação. A transparência desejável encontra-se na faixa entre 20 e 30 cm (Consulpesq 2011).

#### **2.4.1.3. Oxigênio Dissolvido (OD)**

O OD é o parâmetro químico mais importante para os organismos aquáticos. Quando em baixa concentração, pode atrasar o crescimento, reduzir a eficiência alimentar e aumentar a incidência de doenças e de morte. (Kubitza 2003). A concentração de OD varia, ao longo do dia, em função da fotossíntese e da respiração. Logo, quanto maior a quantidade de organismos por unidade de volume, maior a variação diária na concentração desse gás (Kubitza 2003 & Arana 2004).

A disponibilidade de oxigênio na água varia de acordo com a temperatura e a pressão atmosférica.

O nível recomendado de oxigênio dissolvido em produção de tilápias é acima de 4mg/l. A capacidade de suportar baixas concentrações de oxigênio parece ser uma qualidade de todas as espécies de tilápias, podendo inclusive sobreviver em níveis tão baixos quanto 1mg/litro. A concentração de 0,1mg/litro tem sido considerada como letal para *O. niloticus* e *O. mossambicus* (Polli *et al.*, 2004).

#### **2.4.1.4. pH**

O pH é um parâmetro muito importante nos ambientes aquáticos, podendo ser a causa de muitos fenômenos químicos e biológicos, porém também pode ser consequência de outra série de fenômenos. Por exemplo, o pH alcalino é responsável por uma percentagem de amônia não ionizada presente na água, mas este mesmo pH pode ser resultado de outra série de fatores, como abundância de fitoplâncton nos tanques de cultivo (Arana, 2004).

Os valores de pH entre 7 e 8 são os aconselhados para a obtenção dos melhores resultados de engorda, embora algumas espécies possam suportar variação de pH entre 5 e 11 sem apresentar

qualquer efeito deletério. Valores inferiores a 3,5 e acima de 12 causam mortalidade total em menos de 6 horas de exposição (Polli *et al.*, 2004).

#### **2.4.1.5. Amônia**

A amônia é proveniente da decomposição da matéria orgânica e dos excretos nitrogenados liberados pelos organismos presentes na água. Quando o teor de OD e o pH estão dentro dos limites considerados ideais, a amônia é convertida em nitrito e depois em nitrato, não ficando acumulada na água (Esteves, 1998).

Altas concentrações do íon amônio influenciam fortemente a dinâmica do oxigênio dissolvido, pois o processo de nitrificação consome grande quantidade deste gás (Matos, 2004).

#### **2.4.1.6. Alcalinidade**

A alcalinidade consiste na concentração total de bases no meio aquático, confere resistência a mudanças de pH, prevenindo mudanças bruscas no valor do mesmo (Matos, 2004). Águas com alcalinidade menor que 20 mg/L apresentam baixo poder tamponante, estando sujeitas a grandes variações diárias de pH (Masser, 2004).

#### **2.4.1.7. Nitritos**

O nitrito é um composto intermediário no processo de oxidação da amônia a nitrato. Em altas concentrações, o nitrito é extremamente tóxico para a maioria dos organismos aquáticos (Kubitza 2003). Ele pode oxidar a hemoglobina, deixando-a incapaz de transportar oxigênio, provocando metahemoglobinemia (doença do sangue marrom) (Kubitza 2003 & Arana 2004). Em ambientes com alto teor de OD, a concentração de nitrito é baixa, aumentando em ambientes anaeróbios. Por ser uma forma muito instável, o nitrito geralmente ocorre em baixas concentrações na água (Albarez & Matos 2004). O nitrato tem grande importância nos ecossistemas aquáticos, pois constitui a principal fonte de nitrogênio para os produtores primários (Matos 2004). Em águas com pouco OD, ele pode ser reduzido a nitrogênio (N<sub>2</sub>), óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) ou amônia (NH<sub>3</sub>) (Albarez & Matos 2004).



#### **2.4.2. Parâmetros microbiológicos**

Outro grupo de microrganismos indicadores da qualidade da água são os aeróbios mesófilos heterotróficos, conhecidos como aeróbios totais. A contagem de aeróbios totais pode ser utilizada no monitoramento operacional como um indicador de tratamento, desinfecção e qualidade microbiológica da água, visto que sua ocorrência em grandes quantidades está ligada ao não tratamento ou tratamento inadequado da água e também a ambientes eutrofizados (Silva, 2005).

A presença desses grupos de microrganismos, tais como coliformes termotolerantes e aeróbios totais, nos tanques de criação de peixes mostram a necessidade de um controle rígido de higiene durante o manejo e a manipulação dos produtos originados dessa atividade, a fim de prevenir a transferência de bactérias da água para o peixe e seus derivados (Lorenzon, 2009).

### **2.5. Procedimento Analíticos para Avaliação de bactérias em Peixes**

#### **2.5.1. Caracterização da qualidade ambiental e da água**

De acordo com Rodrigues *et al* (2007) recomenda-se que as coletas sejam realizadas no mesmo horário, preferencialmente no período da manhã, as coletas de amostras biológicas e de água devem ser realizadas antes de os peixes serem manejados.

As variáveis de qualidade da água dos viveiros tais como temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade elétrica devem ser determinadas com auxílio de multiparâmetros ou monoparamétricas, a transparência e a profundidade dos tanques devem ser determinadas com o auxílio do disco de Secchi. Essas variáveis devem ser medidas na entrada e na saída de água, nos mesmos tanques de onde serão amostrados os peixes para análise (Rodrigues *et al* 2007).

#### **2.5.2. Amostragens de peixes e colecta de amostras biológicas**

Após a colecta das variáveis da água deve ser realizada a amostragem dos peixes. O número de peixes a ser amostrado deve ser pré-determinado considerando-se a prevalência das diferentes doenças, caso já existam estudos relacionados (Canon *et al* 2001).

A colecta de amostras bacterianas é realizada utilizando swab estéril. Este deve ser colocado em contacto com o órgão ou lesão, levemente rotacionado até que toda a sua superfície seja preenchida com material. Os órgãos de eleição para a pesquisa de amostras são cérebro e o rim

dos peixes, os quais devem ser assepticamente retirados, o material coletado deverá ser semeado em meios de cultura (líquido e sólido) próprios para cada tipo de suspeita conforme metodologia específica para cada tipo de bactéria (Klesius *et al* 2000).

## **2.6. Meios de Cultura das bactérias**

### **2.6.1. Cultivo de *Aeromonas hydrophila***

As amostras suspeitas devem ser semeadas em meio “tryptone soy Agar” (TSA) e “brain heart Infusion” (BHI) para visualização do formato e textura da colônia, incubadas por 24 horas a 25 °C e 28°C, respectivamente. Em seguida, as colônias características devem ser submetidas ao exame de coloração de Gram, motilidade, oxidase e catalase. Uma colônia isolada é então incubada em Tryptone Soy Broth (TSB) nas mesmas condições citadas acima e armazenadas com 30% de glicerol a -70 °C (Klesius *et al* 2005).

### **2.6.2. Cultivo de *Flavobacterium columnare***

O material coletado é semeado em meios de cultura (líquido e sólido) próprios para *F. columnare* e incubados a 25 °C, por de 24 a 48 horas. O meio sólido é composto por infuso de filé de peixe 100 mL; extrato de levedura 5,0 mL; acetato de sódio 0,02 g; ágar 2,5 g, pH 6.8 e autoclavado a 121 °C por 15 minutos em volume de 100 ml, distribuídos em placas de Petri para sementeira (Pilarski *et al* 2008).

As colônias características são submetidas ao exame de coloração Gram, catalase e oxidase e inoculadas em erlenmeyers contendo 6,0 mL de meio líquido para isolamento de *F. columnare*, composto por infuso de filé de peixe e incubadas a 25 °C por 48 horas. Após obtenção da cultura pura, seu armazenamento é realizado com 30% de glicerol a -70 °C (Pilarski *et al* 2008).

### **2.6.3. Cultivo de *Streptococcus agalactiae***

Os swabs coletados com material das lesões características de rim e encéfalo devem ser inoculadas em meios de cultura TSB suplementado com sangue desfibrinado de ovelha e repicados e incubados a 25 °C, por 24 a 48 horas, para visualização do formato e textura da colônia (Keya, 2005).

As colônias características devem ser submetidas ao exame de coloração de Gram, catalase e oxidase. As colônias identificadas devem ser inoculadas em meios de cultivo nutritivos adicionados de glicerol para armazenamento a -80°C (Keya, 2005).

#### **2.6.4. Coliformes totais em meio VRBA**

Segundo o Manual Oxoid (2000) o meio Ágar Vermelho Violeta Bile Lactose (VRBA) é um meio seletivo para a detenção e enumeração de coliformes. O meio tem sido utilizado para a determinação do conteúdo de coli-aerogenes na água, e produtos alimentícios. Os microrganismos que fermentam a lactose atacam rapidamente a lactose do meio produzindo colônias púrpuras circundadas por halos púrpura, já os microrganismos não fermentadores de lactose ou que fermentam esse açúcar tardiamente produzem colônias pálidas com zonas esverdeadas.

#### **2.6.5. Meio de cultura TBX**

É um meio de cultura para bactérias que contém os nutrientes e as condições necessárias para o desenvolvimento de colônias, sendo específico o meio TBX para as *E. coli*, que, quando presentes, adquirem uma cor verde, distinguindo-se das outras bactérias existentes (Manual Oxoid 2000).

#### **2.6.6. Identificação molecular das bactérias**

A bactéria selecionada é submetida à extração de ADN para a identificação de sua espécie. A metodologia do PCR é realizada com primers específicos (Wilson 1997 & Keya 2005).

Os produtos isolados são submetidos à eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídeo e os fragmentos visualizados sob luz ultravioleta e comparados com padrões de peso molecular para confirmação da identidade dos mesmos (Chacón *et al* 2003).

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Materiais

##### 3.1.1. Materiais para as análises da água

- ♣ Bureta de 50ml;
- ♣ Pipeta volumétrica de 5 e 25 ml;
- ♣ Balão volumétrico de 50 e 100 ml;
- ♣ Becker de 100 ml
- ♣ Frasco Erlenmeyer de 250ml;
- ♣ Solução padrão EDTA 0,01 M;
- ♣ Solução tampão;
- ♣ Indicador ericromato Black-T;
- ♣ Turbidímetro;
- ♣ Células de amostra de vidro incolor;
- ♣ Balão volumétrico de 100ml;
- ♣ Pipeta de 5ml;
- ♣ Pinças redondas para manusear a membrana filtrante;
- ♣ pHmetro com precisão de  $\pm 0.1$ ;
- ♣ Membrana filtrante composta por esterres de celulose com 47nm e com poro nominal de 0,4  $\mu\text{m}$  com grelha.
- ♣ Conjunto de filtração;
- ♣ Filtros de membrana de 0,1  $\mu\text{m}$ ;
- ♣ Incubadoras controladas por termostato à  $36\pm 2^\circ\text{C}$ ;
- ♣ Equipamento de filtração;
- ♣ Elermayer e bomba a vácuo;
- ♣ Placas de Petri;
- ♣ Tubos de ensaio;
- ♣ Termómetro;
- ♣ Disco de SECHI;

##### 3.1.2. Materiais e equipamentos para análises microbiológicas dos peixes

- ♣ Misturador (mixer) com varias velocidades;
- ♣ Incubadora controlada por termóstato a  $44^\circ\text{C}$ ;
- ♣ Banho-Maria a  $44^\circ\text{C}$ - $47^\circ\text{C}$ ;
- ♣ Homogeneizador com os respectivos sacos plásticos esterilizados;
- ♣ Autoclave para esterilização a vapor ( $121^\circ\text{C}$  por 15 minutos)
- ♣ Estufa de esterilização ( $170^\circ\text{C}$  por uma hora);j
- ♣ Conta-colonias;

- ♣ Bico de Bunsen;
- ♣ Vortex mixer (agitador);
- ♣ Frascos para as amostras;
- ♣ Frascos para os meios de cultura;
- ♣ Stomacher;
- ♣ Balança com capacidade de 200g e sensibilidade de 0.1g;
- ♣ Copos de vidro esterilizados, cobertos com papel de alumínio;
- ♣ Frascos de vidro esterilizados contendo diluentes;
- ♣ Placas de Petri esterilizadas com 15x90/100mm de diâmetro;
- ♣ Tubos de ensaio;
- ♣ Pipetas graduadas de 1mL-10mL;
- ♣ Facas, espátulas, pinças, tesouras e colheres esterilizadas para manusear as amostras.

### 3.2. Metodos

#### 3.2.1. Caracterização do local em estudo

O distrito de Chókwè está situado a Sul da província de Gaza, no curso médio do rio Limpopo, tendo como limites a Norte o rio Limpopo que o separa dos distritos de Massingir, Mabalane e Guijá, a Sul o distrito de Bilene e o rio Mazimuchope por distrito de Bilene, Chibuto e Xai-Xai, a Este confina com os distritos de Bilene e Chibuto e a Oeste com os distritos de Magude e de Massingir (MAE 2012).

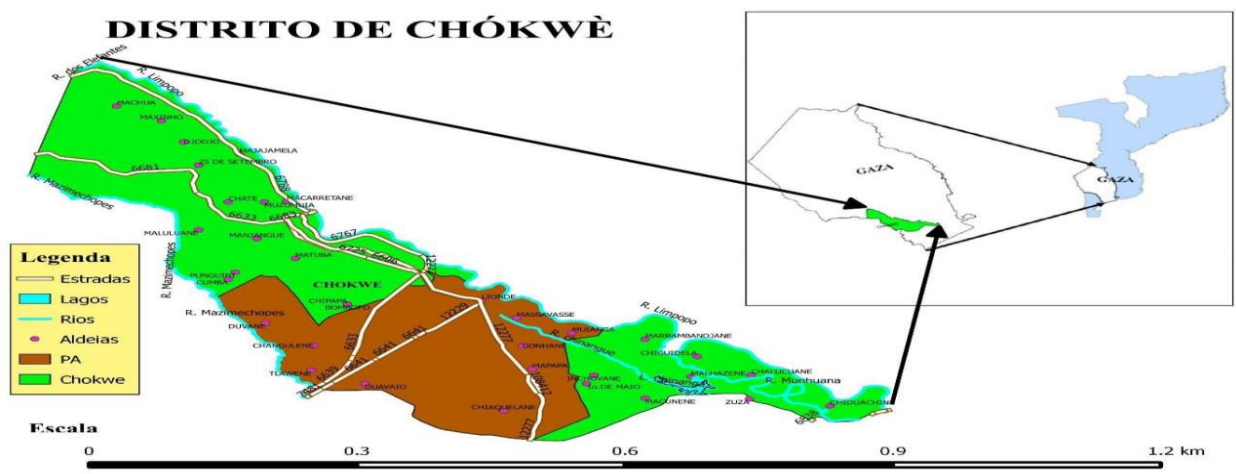


Figura 1: Mapa do distrito de Chókwè

Fonte: Autora (2019)

### **3.2.2. Clima**

O clima do distrito é dominado pelo tipo semiárido (seco de savana), onde a precipitação varia de 500 a 800mm. As temperaturas médias anuais variam entre os 22°C e 26°C e a humidade relativa média anual entre 60-65% (MAE 2012).

A baixa pluviosidade, aliada às elevadas temperaturas, resulta numa acentuada deficiência de água. A irregularidade das chuvas ocasiona estiagem e secas frequentes, mesmo durante a estação das chuvas (MAE 2012).

### **3.2.3. Hidrografia**

O distrito tem um grande potencial hidrográfico, sendo banhado pela margem direita do Rio Limpopo. O distrito possui um enorme potencial para o desenvolvimento da piscicultura, conta com vários tanques piscícolas localizados no Posto Administrativo de Lionde, e em Xilembene dos quais alguns pertencem ao sector privado e outros pertencentes ao Estado. Existe no distrito um projeto-piloto na Barra de Mapapa, para o fornecimento de alevinos, treinamento e demonstrações de técnicas de piscicultura e assegurar a assistência técnica (MAE 2012).

## **3.3.Trabalho de campo**

O estudo foi realizado num período de 2 meses (18 de Fevereiro a 18 de Abril), nos tanques piscícolas do ISPG e no LNHAA, foram colectados um total de 30 exemplares de peixes, para às análises microbiológicas. O peixe foi capturado com auxílio de rede de arrasto e puçás, o peixe foi transferido para uma bacia com água do tanque, onde foi mantido durante a colecta das amostras. Em seguida o peixe foi submetido a um exame macroscópico externo, para a observação de qualquer sinal clínico que pudesse indicar a presença de bactérias patogênicas.

Após o exame macroscópico, as amostras de peixe foram empacotadas em sacos plásticos e mantidas sob refrigeração em caixa isotérmica com gelo e transportadas até o LNHAA para a devida triagem.

No dia da colecta foram analisadas parâmetros físicos da água como a temperatura com um termómetro e a transparência foi avaliada com o auxílio do disco de SECCHI. Também foram colectadas 3 amostras de 200 ml água em frascos previamente limpos e esterilizados para as

análises microbiológicas e 3 amostras de 1.5 L de água em garrafas plásticas para análises químicas.

### 3.3.1. Análise dos parâmetros químicos da água

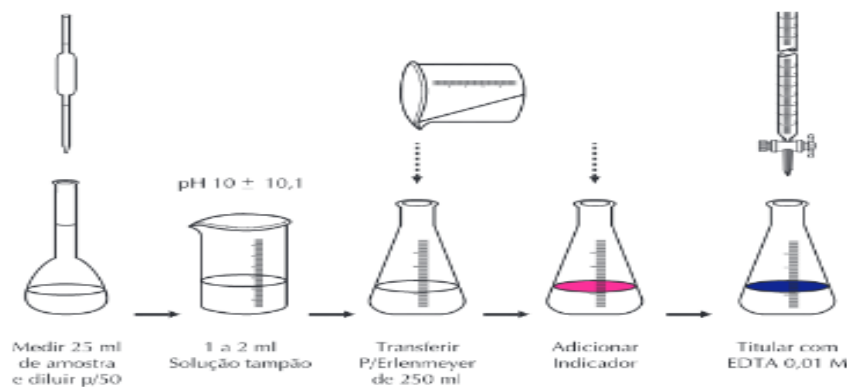
As análises das variáveis químicas da água foram realizadas no LNHA, foram analisados os seguintes parâmetros: amônia, nitrito, nitrato, cloretos, condutividade, turbidez, pH e dureza total.

#### 3.3.1.1. Dureza da água

A dureza total da água foi determinada por meio da titulometria com o uso do EDTA, indicador eriocromo negro e solução tampão de hidróxido de amônio.

#### Técnica

Num balão volumétrico colocou-se 25ml da amostra da água e diluiu-se com 50 ml de água destilada, de seguida transferiu-se a solução para um frasco Erlenmeyer de 250 ml e adicionou aproximadamente 0,05 gramas do indicador Eriochrome Black-T5 e por fim fez-se a titulação com EDTA 0,01 M e agitou-se continuamente até a mudança de cor do vermelho para verde indica o final da titulação.



**Figura 2:** Fluxograma da análise da Dureza

Fonte: Manual de análise de água (2006)

#### 3.3.1.2. pH

O pHmetro foi o aparelho usado para medição do pH. Primeiro é necessário calibrar o aparelho. Colocar 100ml de água em um bequer, mergulhar o sensor do pHmetro, esperar estabilizar para medir o pH.

### 3.3.1.3. Amônia

Para determinação do teor de amônia na água, foi utilizado o método colorimétrico, com leitura em espectrofotômetro a 440nm. Sendo necessário 50 ml de água destilada da amostra, adicionar 2 gotas de EDTA em cada amostra e 2 ml do reagente Nessler's manter a temperatura do ambiente por 15 minutos até que forme uma nuvem branca e mediu-se no espectrofotômetro as amostras que mudaram de cor. A toxicidade da amônia varia conforme o pH, a temperatura, oxigênio dissolvido, dureza e conteúdo de sais da água.

### 3.3.1.4. Nitritos

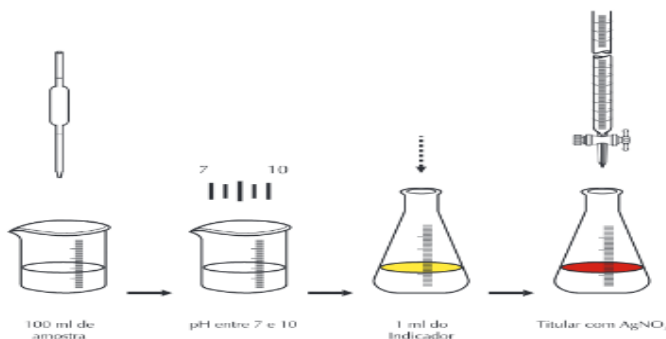
Para determinação do teor de nitrito na água, foi utilizado o método colorimétrico, com leitura em espectrofotômetro. Este método consiste em pipetar 5ml de água em um tubo de ensaio, com réplica. Adicionar 1 ml de ácido sulfâmico em cada ensaio, posteriormente adicionou-se 1ml de alfa nafilamina que funcionou como um indicador o tempo de reação levou 15 minutos, a medição fez-se no espectrofotômetro a 550nm. Os nitritos após as reações tendem a rosa.

### 3.3.1.5. Cloretos

Aos cloretos foram determinados através do método de titulação com nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ )

#### Técnica

Colocou-se 100ml da amostra de água no Erlenmeyer e ajustou-se o pH entre 7 e 10 com NaOH (Hidróxido de sódio) ou  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Ácido sulfúrico), adicionou-se 1ml da solução indicadora de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  (Cromato de potássio) e a titulação foi feita com a solução padrão de Nitrato de prata 0,0141 N até a viragem para amarelo avermelhado que é o ponto final da titulação.



**Figura 3:** Fluxograma da análise dos cloretos

Fonte: Manual de análise de água (2006)



### 3.3.1.6. Turbidez

A turbidez foi determinada através do método Nefelométrico.

### Procedimento

Primeiro calibrou-se o Turbidímetro de acordo com as indicações da firma fabricante, de seguida agitou-se a amostra suavemente e esperou-se que as bolhas de ar desaparecessem e colocou-se na célula da amostra do Turbidímetro e fez-se a leitura diretamente na escala do instrumento.

### 3.3.2. Parâmetros microbiológicos da água

A água foi analisada pelo método de membrana filtrante que consistiu na filtração de uma certa quantidade de água, por meio da membrana filtrante que retém as bactérias.

#### 3.3.2.1. Meios de Cultura

- ♣ Membrana Lauryl Sulphate Broth
- ♣ Violet-Red Bile Agar (VRBA) - para pesquisa coliformes totais
- ♣ Plate Count Agar (PCA) - para pesquisa de microrganismos viáveis a 37° C
- ♣ Tryptone-Bile-Glucuronidase Medium (TBX) - para pesquisa de *Escherichia coli*
- ♣ BHI- para pesquisa de *Aeromonas*

#### 3.3.2.2. Filtração

Colocou-se na peça esterilizada (flamejada com álcool) a membrana filtrante, com cuidado colocou-se o copo (funil), que estava ligado ao elermayer e a bomba a vácuo.

Filtrou-se 100ml da amostra de seguida removeu-se a membrana filtrante e colocou-se no meio sólido e seco adequado para o crescimento das bactérias.

#### 3.3.2.3. Incubação e contagem

A incubação foi feita a 36±2°C num período de 24 a 48h. A contagem foi feita após a retirada da incubadora, usou o conta-colônias para a quantificação das colônias suspeitas.

### 3.3.3. Análise microbiológica dos peixes

#### 3.3.3.1. Preparação das amostras de peixes e diluições

Para a pesquisa das bactérias de interesse, 10g da superfície e musculatura de cada amostra de pescado foram pesadas e homogeneizadas com 90ml de água peptonada tamponada em garrafas estéreis. A homogeneização foi feita para garantir que a carga bacteriana existente no interior da amostra passasse para o diluente. A homogeneização foi feita no STOMACHER num período de 30-60 segundos.

A partir dessa diluição inicial  $10^{-1}$  foram preparadas diluições seriadas, até  $10^{-4}$ , usou-se água peptonada 0.1% com pH entre 6.8-7. As diluições foram usadas num curto período e mantidas na geladeira (+4°C) para uso posterior, caso fosse necessário repetir-se as análises.

#### 3.3.3.2. Pesquisa de *Aeromonas* spp

Alíquotas de 0,1 ml das diluições (até  $10^{-4}$ ) foram semeadas em BHI, suplementados com ampicilina (0,4%) previamente reconstituída em água destilada estéril e incubadas por 24 horas a 35°C. De seguida, realizou-se a contagem das colônias suspeitas, as quais apresentaram uma coloração verde escura, opacas e com centro preto.

#### 3.3.3.3. Pesquisa de *Pseudomonas* spp

Alíquotas de 0,1 ml foram semeadas na superfície do Ágar Cetrimide e incubadas a 35°C por até 48 horas. As colônias pequenas com pigmento esverdeado, características de *Pseudomonas* no Ágar Cetrimide, foram quantificadas.

#### 3.3.3.4. Pesquisa de *Escherichia coli*

Alíquotas de 0,1 ml foram semeadas na superfície de TBX e incubadas a 37°C durante 24 horas. De seguida procedeu-se com a contagem das colônias suspeitas, as quais apresentavam coloração amarela.

### 3.3.3.5. Pesquisa de microrganismos viáveis a 37°C (Aeróbios totais)

Alíquotas de 0,1 ml foram semeadas na superfície de PCA e incubados a 37°C durante 24 horas. As colônias típicas amarelas foram quantificadas independentemente do seu tamanho.

### 3.3.4. Determinação da taxa de prevalência das bactérias

Os dados de prevalência, intensidade média e abundância média de parasitos foram calculados segundo Bush *et al.* (1997):

$$(1) \text{ Taxa de prevalência} = \frac{\text{Número de peixes parasitados}}{\text{Número de peixes examinados}} \times 100$$

$$(2) \text{ Intensidade média} = \frac{\text{número total de parasitos}}{\text{número de peixes infectados}}$$

$$(3) \text{ Abundância média} = \frac{\text{Número total de parasitos na amostra}}{\text{número de peixes examinados (infectados e não infectados)}}$$

$$(4) \text{ Dominância média relativa} = \frac{\text{Quantidade de uma espécie de parasitos}}{\text{Quantidade total de parasitos}}$$

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Amostras de peixe

No presente estudo, nas amostras peixes colectadas nos tanques piscícolas do ISPG foi observada e identificada a presença das seguintes bactérias: *Escherichia Coli*, *microrganismos viáveis a 37°C*, *Aeromonas spp* e *Pseudomonas spp*.

Entre os exemplares analisados, alguns apresentavam sinais clínicos da presença de bacterioses: os peixes infectados por *Aeromonas* apresentaram lesões hemorrágicas no corpo e na cabeça e com uma coloração avermelhada em grande extensão do corpo e os infectados por *Pseudomonas* apresentaram também hemorragias, surgimento de manchas brancas despigmentadas na pele e perdas de escamas. Os níveis encontrados podem causar septicemia hemorrágica.

**Tabela 1: Resultado das análises microbiológicas em peixes**

No presente trabalho identificou-se 4 espécies de bactérias nas amostras analisadas de peixe em níveis significativos como ilustra a tabela abaixo.

Parâmetros Analisados	Resultados	Limite admissível	Unidade
<i>Pseudomonas spp.</i> ,	$1 \times 10^2$	$1.2 \times 10^4$	UFC/g
<i>Aeromonas spp</i>	$2 \times 10^2$	$3.2 \times 10^5$	UFC/g
Microrganismos viáveis a 37°C	$5.3 \times 10^3$	$10^7$	UFC/g
<i>Escherichia Coli</i>	$4.0 \times 10^2$	$5 \times 10^2$	UFC/g

UFC/g: Unidade formadora de colónias por gramas

### 4.2. Amostras de água

**Tabela 2: Resultado dos parâmetros físicos e químicos da água**

Podem ser observados abaixo os parâmetros físico-químicos da água mensurados nos tanques piscícolas do ISPG durante o período da pesquisa. O pH, amônia, nitrato e nitrito apresentaram valores quase que semelhantes em todas as amostras de água analisadas durante o período de estudo. A transparência da água apresentou com valor mais baixo na 2ª amostra de água analisada. A temperatura da água apresentou níveis desejáveis para o cultivo de tilápia nilótica.

Análise Microbiológica da Água e da Tilápia Nilótica (*Oreochromis niloticus*)

Cultivada nos Tanques Piscícolas do ISPG

Parâmetro	Resultados			Método	Unidade
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3		
Temperatura	29	26	29	-	°C
pH	6.97	6.77	7.38	Potenciométrico MI BO5	Mg/L
Transparência	25	15	26	-	Cm
Nitritos	<0.03LQ	0.24	<0.03LQ	Absorção molecular MI CO6	Mg/L NO2
Nitratos	<0.5LQ	<0.5LQ	<0.5LQ	Absorção molecular MI CO7	Mg/L NO3
Condutividade	541	518	449	Condutimétrico MI BO2	
Amônia	<0.04LQ	<0.04LQ	<0.04LQ	Absorção molecular	Mg/L NH3
Dureza total	120	96	92	Volumétrico MI C14	Mg/L CaCO3
Cloretos	88.63	85.08	159.53	Volumétrico MI C17	Mg/L Cl
Turbidez	58	46	41	Turbidimétrico MI B12	NTU

MI – Método interna LQ- Limite de quantificação

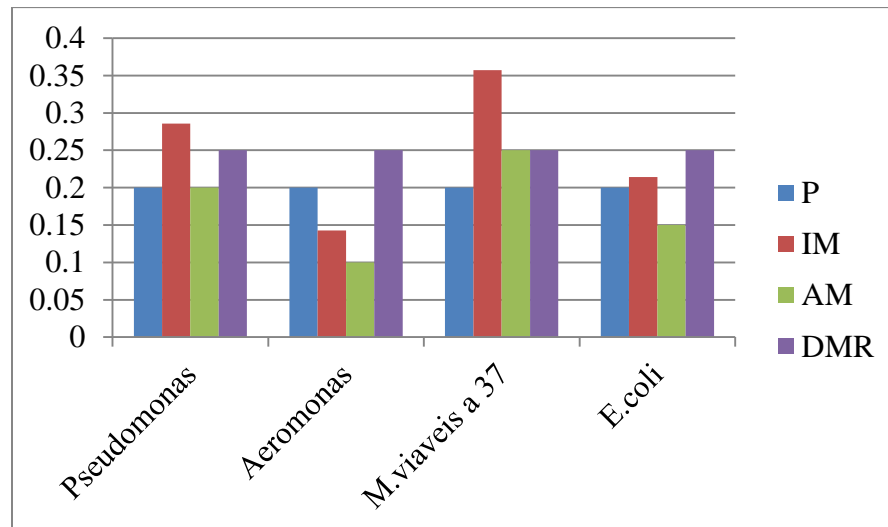
**Tabela 3:** Parâmetros microbiológicos da água

Parâmetros microbiológicos	Resultados			Unidade
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	
Quantificação de coliformes totais	>100	>100	>100	Ufc/100mL
Quantificação de coliformes fecais	>100	>100	>100	Ufc/100mL
Quantificação de Escherichia Coli	>100	>100	>100	Ufc/100mL

**Tabela 3.** Dados da taxa Prevalência (P), intensidade média (IM), abundância média (AM) e dominância média (DMR) dos parasitas encontrados na tilápia do Nilo cultivados nos tanques piscícola do ISPG.

N° de peixes parasitados	Bacterias	P (%)	IM	AM	DMR
4	<i>Pseudomonas</i>	0.2	0.2857	0.2	0.25
2	<i>Aeromonas</i>	0.2	0.1428	0.1	0.25
5	<i>Micoorganismos viáveis a 37°C</i>	0.2	0.3571	0.25	0.25
3	<i>Escherichia Coli</i>	0.2	0.2143	0.15	0.25

**Figura 4.** O gráfico acima ilustra a variação dos índices de cada parasita (Bactérias) no peixe cultivado.



**P**-Taxa Prevalência;

**IM**- Intensidade média;

**AM** -Abundância média e;

**DMR**- Dominância média relativa.

## 5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Das bactérias pesquisadas nos peixes, as do gênero *pseudomonas* foram as mais frequentes depois dos microrganismos viáveis a 37°C. Este microrganismo é um dos principais patógenos oportunistas que ocorre com frequência e com maior impacto econômico na produção comercial de peixes na piscicultura (Kubitza 2004).

Os valores encontrados ( $1 \times 10^2$ ) nas amostras de peixes contaminadas por *Pseudomonas* spp no presente estudo foi baixo comparado aos resultados de Ivana Castilho (2012) que isolou *pseudomonas* spp em 100% em amostras de tilápia fresca e obteve uma contagem alta (até  $5 \times 10^3$ ). Os valores obtidos nas amostras contaminadas por *Pseudomonas* foram iguais em todos peixes analisados, o que significa que a qualidade da água pode ter sido prejudicial aos peixes em relação a esse patógeno.

Tilápias são peixes tropicais que apresentam conforto térmico entre 27 e 32° C. Temperaturas acima de 32° C e abaixo de 27° C reduzem o apetite e o crescimento. Abaixo de 20° C, o apetite fica extremamente reduzido e aumentam os riscos de doença (Kubitza 2000). Durante o período da pesquisa, a temperatura esteve dentro dos padrões recomendados por Kubitza, 2000, para o bom crescimento e desenvolvimento da tilápia nilótica, onde a temperatura mínima foi de 26°C e máxima de 29°C.

A transparência da água desejável para o cultivo de tilápias encontra-se na faixa entre 20 e 30 cm (Consulpesq 2011).

Durante o período de pesquisa, a transparência na amostra 2 da água não apresentou os padrões recomendados por Consulpesq 2011, observou uma transparência mínima de 15 cm na água de cultivo o que significa que existe uma alta produtividade de plâncton.

As bactérias do gênero *Pseudomona* e os microrganismos viáveis a 37°C foram as mais prevalentes no presente estudo e apresentaram maior intensidade.

Um estudo similar realizado no Egito por Eissa *et al*, (2010) observou-se, uma maior taxa de prevalência de *Pseudomonas* em *O. niloticus* proveniente dos lagos de Qaroun e Wadi-El Rayan. Neste estudo, Eissa *et al*. (2010) observou sinais típicos de septicemia hemorrágica ocasionada por esta bacteriose, como: coloração avermelhada por todo o corpo, hemorragia, inchaço na região abdominal, com presença de líquido sanguíneo e olhos opacos.

No presente estudo exemplares de tilápia analisados apresentaram sinais clínicos da presença de bacteriose semelhantes aos do estudo de Eissa *et al* (2010). Os peixes contaminados por *Pseudomonas* apresentaram hemorragias em grande extensão do corpo, perda de escamas e surgimento de manchas brancas na pele.

A taxa de prevalência 0,2% de peixes contaminados por *Aeromonas* neste estudo pode ser considerado baixo quando comparado aos resultados de Aline Zago (2012), que isolou *Aeromonas* das amostras de tilápia nilótica e encontrou uma taxa de prevalência de 7,9% nas amostras de rim e cérebro contaminados com essa bactéria. Porém, este estudo avaliou do ponto de vista parasitológico e microbiológico, exemplares de tilápias do Nilo (*O. niloticus*) provenientes de cultivo em tanques-rede na bacia do rio Grande em São Paulo e não a qualidade sanitária de peixes cultivados logo após a captura.

Segundo Cardoso *et al.* (2003), em ambientes naturais, patógenos indicadores de poluição fecal são raramente encontrados no pescado. Cardoso *et al.* (2001) afirmaram que a principal via de contaminação na piscicultura, por coliformes e *E. coli* é a água, sendo que quando as contagens de *E. coli* no pescado são altas isto significa que existe uma fonte poluidora recente.

Um estudo feito por Ivana Castilho (2012) observou a presença de coliformes termotolerantes em altas concentrações e sugeriu que a contaminação ocorreu principalmente pelas fezes das próprias tilápias, pois foi observado conteúdo fecal nos sacos de coleta.

No presente estudo foram observados níveis elevados de Coliformes e *E. Coli* (> 100) isto pode ter ocorrido devido a uma provável contaminação de origem fecal na fonte de abastecimento de água usada nesta unidade de produção.



## 6. CONCLUSÃO

Os exemplares analisados apresentaram sinais clínicos da presença de bacterioses. No músculo da tilápia nilótica foram identificadas bactérias do gênero *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Microrganismos viáveis a 37°C* (aeróbios totais) e *E. Coli* e bactérias do gênero coliformes e *E. Coli* na água de cultivo. Os níveis encontrados podem ocasionar vários tipos de doença como a Septicemia hemorrágica nos peixes cultivados e conseqüentemente causar impactos econômicos consideráveis na produção comercial nos peixes cultivados nesta unidade de produção.

Os parâmetros de qualidade de água influenciaram na ocorrência de microrganismos patogênicos nos peixes cultivados.

## 7. RECOMENDAÇÕES

- ♣ Recomenda-se que esta unidade de produção deve tomar medidas de biossegurança, para melhor controlar a ocorrência dos agentes patogénicos;
- ♣ Deve tomar-se medidas profiláticas em casos de registo de sinais que possam indicar a presença de organismos patogénicos nesta unidade de produção;
- ♣ Sugere-se também que seria importante a aquisição de equipamentos para o monitoramento da qualidade de água e melhorar as técnicas de manejo sanitário empregues nesta unidade de produção com vista a melhorar o valor comercial dos peixes cultivados e minimizar os prejuízos económicos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBANEZ, J. R.; MATOS, A. T. Aqüicultura. In: MACEDO, J. A. B. Águas & águas. 3. ed. Belo Horizonte: CRQ - MG, 2004.
2. BOSCOLO, W. R.; HAYASHI, C.; MEURER, F.; FEIDEN, A.; BOMBARDELLI, R. A. Digestibilidade Aparente da Energia e Proteína das Farinhas de Resíduo da Filetagem da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e da Corvina (*Plagioscion squamosissimus*) e Farinha Integral do Camarão Canela (*Macrobrachium amazonicum*) para a Tilápia do Nilo. *Revista Brasileira de Zootecnia.*, v.33, n.1, p.8-13, 2004
3. BUSH, A.O.; LAFFERTY, K.D.; LOTZ, J.M.; SHOSTAK, A.W. Parasitology meets ecology on its own terms. Margolis et al. Revisited. **J. Parasitol.** v. 83. N. 4, p. 575-583, 1997.
4. CANNON, R. M. Sense and sensitivity—designing surveys based on an imperfect test. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, NL, v. 49, 2001, p.141-163.
5. CARDOSO, A. L. P. TESSARI, E. N. C., CASTRO, A. G. M.; KANASHIRO, A. M.; ZANATTA, G.F. Incidência de coliformes e *Salmonella* sp em água proveniente de abatedouro avícola. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 111, p. 73-78, ago. 2003.
6. CARDOSO, A. L. P.; TESSARI, E. N. C.; CASTRO, A. G. M.; KANASHIRO, A. M. I. A técnica da membrana filtrante, aplicada ao estudo bacteriológico da água da rede de abastecimento utilizada pela população de Descolvado, SP. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 82, p. 33-38, mar. 2001.
7. CASTILHO, I. V. **Qualidade microbiológica do ambiente e da Tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) produzida em sistema de tanques-rede no reservatório de Chavantes**, -Sp. Dissertação de (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) -Universidade Estadual Paulista. Batucatu.2012.
8. CHACÓN, M. R.; FIGUERAS, M. J.; CASTRO-ESCARPULLI G, SOLER L. Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 84, 2003, p. 269-278.
9. CIPRIANO, R. C.; Bullock, G. L.; Pyle, S. W. (2001). *Aeromonas hydrophila* and motile *Aeromonas* septicemias of fish. *US Fish & Wild life Publications*.

10. CYRINO, J. E. P.; URBINATTI, E. C.; FRACALOSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. São Paulo: TecArt, 2004. 533p.
11. Eissa, N. M. E.; Abou El-Ghiet, E. N.; Shaheen, A. A.; Abbass, A. (2010). Characterization of *Pseudomonas* species isolated from tilapia "*Oreochromis niloticus*" in Qaroun and Wadi-El-Rayan Lakes, Egypt. *Global Veterinaria* 5 (2), 116-121.
12. ESTEVES, F. A. Fundamentos de Limnologia. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1998. 602p.
13. FAO. **The State of world fisheries and aquaculture (2008)**. Roma, 230 p.
14. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura**. Roma: Departamento de Pesca e Aquicultura da FAO, 2010
15. JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical Microbiological Reviews*. V. 23, n. 1., p. 35-73, 2010.
16. JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. Modern food microbiology. 7 ed. New York: Springer, 2005. 790 p.
17. KEYA S. Development of a rapid identification method for *Aeromonas* species by multiplex-PCR. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 51, 2005, p. 957-966.
18. KLESIUS PH, SHOEMAKER CA, EVANS JJ. 2000. Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, Amsterdam, NL, v. 188, p. 237-246.
19. KUBITZA, F. (2000). *Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial*. F. Kubitza, Jundiaí.
20. KUBITZA, F. Antecipando-se às doenças na tilapicultura. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 89, ma./Jun.2005.
21. KUBITZA, F. Qualidade da água no cultivo de peixes e camarões. Jundiaí: Fernando Kubitza, 2003.
22. KUBITZA, F. Sistemas de recirculação: sistemas fechados com tratamento e reuso da água. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 95 mai/jun 2006
23. Kubitza, Kubitza, L. M. M. (2004). *Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados*. F. Kubitza, Jundiaí.

24. LIMA, L. C. Doenças de importância econômica em piscicultura. Palestra. In: III **Seminário de Aquicultura, Maricultura e Pesca**, Belo Horizonte, 2007.
25. LIZAMA, M. A. P.; TAKEMOTO, R. M.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; AYROZA, L. M. S. & PAVANELLI, G. C. Relação parasito-hospedeiro em peixes de pisciculturas da região de Assis, Estado de São Paulo, Brasil. 1. *Oreochromis Niloticus* (Linnaeus, 1757). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 29, n. 2, p. 223-231, 2007.
26. LORENZON, Cíntia Sobue. Perfil microbiológico de peixes e água de cultivo em pesque-pagues situados na região nordeste do estado de São Paulo. 2009. 52f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal-SP, 2009. 46
27. Manual OXOID, 1<sup>o</sup> Edição, 2000 Português, traduzido por Bernadete D. G. M. Franco, Maria Eloiza Landgraf, Mariza Landgraf.
28. Manual Prático de análise de água, 2ª Edição. Rev. Brasília. Fundação Nacional de Saúde. 2006.146p.
29. MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W.R.; et al. Lipídeos na alimentação de alevinos revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.2,p.566-573, 2002.
30. Ministério da Administração Estatal (2012) <http://www.portaldogoverno.gov.mz>
31. MIRANDA, J. C.; MAZZONI, R.; SILVA, C. E. A. Ocorrência da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) Linnaeus, 1758 na microbacia do Rio Mato Grosso, Saquarema, Estado do Rio de Janeiro. **Revista de Saúde e Biologia**, v.5, n.2, p.47-50, jul/dez 2010.
32. MOREIRA, H. L. M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; ZIMMERMANN, S. **Fundamentos da moderna aquicultura**. 1 ed. Canoas: ULBRA, 2001. 200p. 17p.
33. MPA. MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. Produção da aquicultura continental por espécie. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura em 2010**, p. 66-67, 2012.
34. MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 6 ed. **Rio de Janeiro**: Elsevier, 2009.

35. NUNES, B. G. **Enfermidades dos peixes**. 2007. 39 f. Tese (Pós-graduação em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal) – Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro, 2007.
36. OKURA, M. H.; SIQUEIRA, K. B. Enumeração de coliformes totais e coliformes termotolerantes em água de abastecimento e de minas. **Revista Higiene Alimentar**, Mirandópolis, v. 19, n. 135, p. 86 - 91, 2005.
37. PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. **Doenças de Peixes. Profilaxia, Diagnóstico e Tratamento**. Maringá: EDUEM, 2008.
38. Piasecki, W., Goodwin, A. E., Eiras, J. C. & Nowak, B. F. 2004. Importance of Copepoda in Freshwater aquaculture. *Zoological Studies*, 43(2): 193-205.
39. PILARSKI, F.; ROSSINI, A. J. ; CECCARELLI, P. S. Isolation and characterization of *Flavobacterium columnare* from four tropical fish species in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 68, n. 2, 2008, p. 409-414.
40. RODRIGUES, E. **Pesquisa de *Aeromonas* spp. Em tilápia (*Oreochromis niloticus*), cultivada no estado do Rio de Janeiro - Brasil: isolamento, identificação de espécies e avaliação da sensibilidade antimicrobiana**. 2007. 208 F. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2007.
41. SEBASTIÃO F.A; Nomura D; Sakabe R; Pilarski F.; Hematology and protective performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) naturally infected with *Flavobacterium columnare*. **Braz J Microb**42: 282-289. 74. 2011.
42. SILVA, N.; CATANÚSIO NETO, R.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica da água**. São Paulo: Varela, 2005. 164p
43. SOUZA, M. L. R. Comparação de seis métodos de filetagem, em relação ao rendimento de filé e de subprodutos do processamento da Tilápia-do-Nilo.
44. VINATEA-ARANA, L. Princípios químicos de qualidade da água em aquicultura: uma revisão para peixes e camarões. 2. ed. Florianópolis: Ed. da UFSC, 2003.
45. VISSONI, C. L. Z. **Resistência a antimicrobianos em cepas de *Salmonella* spp, *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. isoladas de carcaças de frango**. 2003. 117 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003 (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 3, p. 1074-1084, jun. 2002.

46. WILSON I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied. Environmental Microbiology**, Washington, D C, v. 63, 1997, p. 3741-3751.
47. WURTS, W. A.; MASSER, M. P. Liming ponds for aquaculture. SRAC Publications, n. 4100, p. 1-5. 2004.
48. ZAGO. A. C. **Análise parasitológica e microbiológica de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques-rede no reservatório de Água Vermelha - SP e suas inter-relações com as variáveis limnológicas e fase de criação**-Sp-. Dissertação de (Mestrado em Ciências Biológicas) -Universidade Estadual Paulista. Batucatu.2012.

**9. APÊNDICES****Meios de Cultura****Meio Gelosado de Membrana Lauryll Sulphate ágar**

<b>Fórmula</b>	<b>g/L</b>
Extracto de levedura	6,0
Lactose	30,0
Vermelho fenol	0,2
Lauryll sulfato sódio	0,2
Água destilada	1000ml
pH	7,4±0,2
Peptona	39,0

Dissolver os ingredientes do meio desidratado comercial em água destilada conforme as recomendações da firma produtora, adicionar 15g de Ágar bacteriological aquecendo até a ebulição para completa dissolução. Arrefecer para o ajustamento do pH a 7,4±0,2.

Esterilizar na autoclave a 121°C/15 minutos, deixar arrefecer a 45°C e distribuir em placas esterilizadas.

**Meio Trytone-bile-glucuronic medium (TBX)**

<b>Formula</b>	<b>g/L</b>
Enzymatic digest cosien	20,0
Bile salt NO3	115
5-bromo4-cloro3-indos	144miu mol



B-D-glucuronic acid (BCIG)	3ml
Água destilada	1000ml
Dimethy sufoxide (DMSO)	9/8

### Preparação

Dissolver o BCIG no diluente recomendado pelo fabricante. Dissolver todos os componentes em água destilada e aquecer. Ajustar o pH se for necessário e após a esterilização terá um pH de  $7,2\pm 0,2$  a  $25^{\circ}\text{C}$ , esterilizar o meio de cultura a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Imediatamente arrefecer o meio de cultura no banho no banho-maria a temperatura de  $44^{\circ}\text{C}$ .

### Meio Plate Count Agar (PCA)

Formula	g/L
Triptone	5,0
Glucose	1,0
Extracto de levedura	2,5
Ágar	15
Água destilada	1000ml

### Preparação

Normalmente usa-se o meio desidratado comercial que prepara-se de acordo com as indicações da firma produtora. Distribuir da forma conveniente e esterilizar a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos.

### Meio Violet-Red Bile Agar (VRBA)

Formula	g/L
Extracto de carne	3,0
Peptona	7,0

Clouto de sódio	5,0
Sais biliars n°3	1,5
Lactose	10,0
Vermelho neutro (solução 1%)	3ml
Violeta de cristal (solução 0,1%)	2ml
Ágar	15,0
Água destilada	1000ml

### Preparação

Este meio também está disponível na forma desidratada que prepara-se de acordo com as indicações da firma produtora. Esteriliza-se por autoclavagem a 121°C por 15 minutos, este meio é preparado no mesmo dia em que se pretende usar.



**Figura A e B:** Peixes acondicionados na bacia após a colecta.

Fonte: Autora (2019)



**Figura C e D:** amostra de peixe com sinais clínicos de presença de *Pseudomonas*.

Fonte: Autora (2019)



**Figura C e D:** Amostras de peixe com sinais clínicos de presença de *Aeromonas*

Fonte: Autora (2019)



**Figura D e E:** Amostra de água para usadas para as análises químicas e microbiológicas.

Fonte: Autora (2019)