

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

***Streptococcus* spp. E *Aeromonas* spp. NA ÁGUA E EM TILÁPIAS  
DO NILO (*Oreochromis niloticus*) E PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS  
DA ÁGUA DE PISCICULTURA EM TANQUES-REDE**

**Maria Isabel Suhet  
Engenheira de Alimentos**

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Julho de 2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

***Streptococcus* spp. E *Aeromonas* spp. NA ÁGUA E EM TILÁPIAS  
DO NILO (*Oreochromis niloticus*) E PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS  
DA ÁGUA DE PISCICULTURA EM TANQUES-REDE**

**Maria Isabel Suhet**

**Orientador: Prof. Dr. Rubén Pablo Schocken-Iturrino**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Microbiologia (Microbiologia Agropecuária).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2011

S947s Suhet, Maria Isabel  
*Streptococcus* spp. e *Aeromonas* spp. na água e em tilápias do  
nilo (*Oreochromis niloticus*) e parâmetros físico-químicos da água de  
piscicultura em tanques-rede / Maria Isabel Suhet. – – Jaboticabal,  
2011  
viii, 86 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011

Orientador: Rubén Pablo Schocken-Iturrino

Banca examinadora: Clovis Wesley Oliveira de Souza, Fabiana  
Garcia, Fabiana Pilarski, Oswaldo Durival Rossi Junior  
Bibliografia

1. Antimicrobianos. 2. Hemólise. 3. Qualidade da água I. Título.  
II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 639.21:556.551

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e  
Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
- UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** *Streptococcus* spp. E *Aeromonas* spp. NA ÁGUA E EM TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*) E PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA DE PISCICULTURA EM TANQUES-REDE

**AUTORA:** MARIA ISABEL SUHET

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. RUBEN PABLO SCHOCKEN ITURRINO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. RUBEN PABLO SCHOCKEN ITURRINO

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. FABIANA GARCIA

Departamento de Descentralização do Desenvolvimento / Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios

Profa. Dra. FABIANA PILARSKI

Centro de Aquicultura da Unesp / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. CLOVIS WESLEY OLIVEIRA DE SOUZA

Departamento de Morfologia e Patologia / Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dr. OSWALDO DURVAL ROSSI JUNIOR

Departamento de Med Vet/Prev e Repr Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 01 de julho de 2011.

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**MARIA ISABEL SUHET** - nasceu em 22 de junho de 1964, natural de Alegre, Espírito Santo, graduou em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal Viçosa, MG, em 1994. Obteve o título de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela Universidade Federal da Paraíba, UFPB, João Pessoa, PB, em 1997. Iniciou sua carreira como docente em 1998 na Universidade Tecnológica do Paraná, Campus de Campo Mourão. Em 2001, foi redistribuída para o Instituto Federal de Educação do Espírito Santo, Campus de Alegre. Em março de 2007 iniciou o curso de Doutorado em Microbiologia Agropecuária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal, SP.

## **AGRADECIMENTOS**

A minha família, por tudo que representa.

Ao Prof. Dr. Ruben Pablo Schocken-Iturrino pela orientação, confiança e apoio ao longo deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Atanásio Alves do Amaral pela indicação e a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lúcia Helena Sipaúba Tavares por ter permitido iniciar esse trabalho.

A Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária Edna Maria Testa Dáquila, a funcionária Rosangela e a Oficial Administrativa do Conselho do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do CAUNESP Veralice Cappatto pela competência solidária da função e sensibilidade para perceber e amenizar a angústia daqueles a sua volta.

Aos professores da FCAV-UNESP do curso de pós-graduação, pelo aperfeiçoamento profissional e aos funcionários, pela eficiência em todos os serviços que lhes foram solicitados, aos pós-graduandos e estagiários pela atenção e colaboração.

Ao Prof. Luiz Augusto do Amaral pela humanidade e especialmente pela sua disponibilidade e presteza em todos os momentos que solicitei seu auxílio, na correção e sugestões de meu trabalho.

A APLJ - Associação dos Pescadores da Lagoa Juara – Sr. Mário Louzada, Sr. Elias Effgen e todos os associados pelo apoio logístico das atividades em campo ao longo deste tempo.

Ao Diretor do IFES/Campus de Alegre - Prof. Carlos Humberto Sanson Moulim, a Coordenadora Geral de Recursos Humanos - Maria Valdete Santos Tannure e seus colaboradores pela ajuda e disponibilidade sempre que solicitados e por suas infinitas intercessões.

Ao Diretor do NEDTEC/UFES/Alegre/ES – Prof. Dr. Edvaldo Teixeira Fialho pela liberação do Laboratório para análises físico-químicas da água, pelas sugestões e colaboração e ao Responsável Técnico Alexander Almeida e sua equipe pela disposição, disponibilidade e competência para contribuir com as

análises, bem como pelo bom humor e coleguismo mesmo nas circunstâncias mais adversas.

Aos Médicos Veterinários do IFES/Campus Alegre/ES – Elias André Dardendo e Sebastião de Paula (*in memoriam*) e do Hospital Veterinário do CAUFES/Alegre/ES - André Gomes Lima e a mestranda Ana Elisa Pato Salgado pela presteza nas solicitações, por jamais ter me dito não, mesmo em momentos mais inoportunos.

A Prof<sup>a</sup> Maria Cristina Junger Dardengo e Prof. Dr. Cesar Ademar Hermes do IFE/ES, ao Prof. Dr. Artur Lima Preto do IFE/SC, ao Prof. Dr. Jose Tarcisio Lima Thiebaut da UENF/RJ e Prof. Dr. Gener Tadeu Pereira da FCAV/UNESP/SP pela atenção, disponibilidade e empenho na realização da parte estatística deste trabalho.

A funcionária Alessandra Ulisses e aos alunos de graduação do Curso Tecnólogo em Aquicultura do IFES/Campus Alegre/ES – André Pelandra, Daiane M. Alves, Leandro L. Dan, Herbert Rodrigo Zanete, Luciana Maria C. Machado, Murilo Valani e Thiago Zorzal pela coragem, paciência e os bons serviços prestados em todas as atividades de laboratório e de campo.

A FIOCRUZ-RJ pela doação das cepas de referência, a FUNDUNESP e ao CNPQ pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

**“Aqueles que, sem saber e sem direito a escolha, mas por sua imprescindibilidade se fizeram constar aqui” – os CAVALOS e os PEIXES.**

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS .....	iii
LISTA DE TABELAS .....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
RESUMO.....	vi
SUMMARY.....	viii
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Parâmetros ambientais na multiplicação microbiana e saúde dos peixes.....	2
2.2. O Gênero <i>Aeromonas</i> .....	5
2.2.1. <i>Aeromonas</i> em água .....	7
2.2.2. <i>Aeromonas</i> em peixes.....	9
2.2.3. <i>Aeromonas</i> em seres humanos.....	10
2.2.4. Virulência de <i>Aeromonas</i> .....	11
2.2.5. Sensibilidade a agentes antimicrobianos por <i>Aeromonas</i> .....	13
2.3. O Gênero <i>Streptococcus</i> .....	14
2.3.1. <i>Streptococcus</i> e gêneros relacionados em peixes.....	16
2.3.2. <i>Streptococcus</i> em seres humanos.....	19
2.3.3. Virulência de <i>Streptococcus</i> .....	21
2.3.4. Sensibilidade a agentes antimicrobianos por <i>Streptococcus</i>	21
III. OBJETIVOS.....	23
IV. MATERIAL E MÉTODOS .....	24
4.1. Localização .....	24
4.2. Coleta das amostras.....	27
4.2.1. Água.....	27
4.2.2. Peixe.....	28
4.3. Preparo das amostras para análise microbiológica.....	29
4.3.1. Água de enxaguadura da superfície dos peixes para pesquisa de <i>Aeromonas</i> e <i>Streptococcus</i> .....	29



4.3.2. Amostra do cérebro para isolamento de <i>Streptococcus</i> .....	30
4.3.3. Amostra do rim dos peixes para isolamento de <i>Aeromonas</i>	30
4.3.4. Amostra de água para a pesquisa de <i>Aeromonas</i> e <i>Streptococcus</i> .....	31
4.4. Isolamento de <i>Streptococcus</i> spp. e isolamento e contagem de <i>Aeromonas</i> spp.....	32
4.5. Expressão do resultado para o gênero <i>Streptococcus</i> e <i>Aeromonas</i> .....	33
4.6. Diferenciação das espécies de <i>Streptococcus</i> .....	34
4.7. Diferenciação das espécies de <i>Aeromonas</i> .....	34
4.8. Antibiograma.....	35
4.9. Parâmetros físico-químicos da água .....	36
4.10. Análise Estatística.....	37
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1. Variação dos parâmetros físico-químicos da água .....	38
5.2. Ocorrência de <i>Aeromonas</i> spp e <i>Streptococcus</i> spp. e população média de <i>Aeromonas</i> spp. ....	47
5.3. Distribuição das espécies de <i>Aeromonas</i> , <i>Streptococcus</i> e de gêneros relacionados.....	51
5.3.1. Distribuição das espécies de <i>Aeromonas</i> .....	51
5.3.2. Distribuição das espécies de <i>Streptococcus</i> e de gêneros relacionados.....	58
5.4. Atividade hemolítica .....	62
5.4.1. Atividade hemolítica dos isolados de <i>Aeromonas</i> .....	62
5.4.2. Atividade hemolítica dos isolados de <i>Streptococcus</i> .....	65
5.5. Resistência a antimicrobianos .....	67
5.5.1. Resistência a antimicrobianos pelas espécies de <i>Aeromonas</i> .....	67
5.5.2. Resistência a antimicrobianos pelas espécies de <i>Streptococcus</i> e de gêneros relacionados.....	70
VI. CONCLUSÕES .....	73
VII. REFERÊNCIAS.....	74

**LISTA DE ABREVIATURAS**

TSA - ágar tripticase soja

TSB - caldo tripticase soja

TSI - ágar tríplice açúcar ferro

O/129 - fosfato de 2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine

OD - oxigênio dissolvido

N-amoniacal - nitrogênio amoniacal

N-NH<sub>3</sub> - amônia na forma não ionizada

N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - íon amônio

N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> - nitrato

N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> - nitrito

P-total - fósforo total

**LISTA DE TABELAS**

	<b>Página</b>
Tabela 1. Dados climatológicos médios, para o município de Vitória, Espírito Santo, Brasil, fornecidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia.....	25
Tabela 2. Diferenciação das principais espécies <i>Aeromonas</i> .....	35
Tabela 3. Valores médios dos parâmetros físico-químicos na água da lagoa e dos tanques-rede nos períodos, seco (abr a set/08), chuvoso (out/08 a mar/09) e o padrão do CONAMA para as águas doces de classe 2.....	39
Tabela 4. Ocorrência de <i>Streptococcus</i> spp. e <i>Aeromonas</i> spp. na água da lagoa, tanques-rede, superfície, rim e cérebro dos peixes, nos períodos seco (abr a set/08) e chuvoso (out/08 a mar/09).....	47
Tabela 5. Resistência a antimicrobianos por espécies de <i>Aeromonas</i> isoladas da água (lagoa e tanques-rede), superfície e rim dos peixes.....	67
Tabela 6. Resistência a antibióticos por espécies de <i>Streptococcus</i> e de gêneros relacionados isolados da água (lagoa e tanques-rede) e superfície dos peixes .....	70

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Mapa do litoral do Espírito Santo com a localização do município de Jacaraípe onde está situada a Lagoa Juara onde foi conduzido o estudo.....	24
Figura 2. Visão lateral do trecho da Lagoa Juara, município da Serra, ES, Brasil, onde localiza a piscicultura. Foto: outubro de 2007.....	26
Figura 3. Valores médios mensais dos parâmetros físico-químicos da água da lagoa e dos tanques-rede, nos períodos seco e chuvoso.....	43
Figura 4. Distribuição das espécies de <i>Aeromonas</i> isoladas das amostras de água da lagoa, água dos tanques-rede, superfície e rim dos peixes, nos períodos seco (a) e chuvoso (b).....	54
Figura 5. Distribuição das espécies de <i>Streptococcus</i> e gêneros relacionados isolados da água da lagoa, água dos tanques-rede e superfície dos peixes, nos períodos seco (a) e chuvoso (b).....	59
Figura 6. Atividade hemolítica dos isolados de <i>Aeromonas</i> da água (lagoa e tanques-rede), superfície e rim dos peixes.....	63
Figura 7. Atividade hemolítica dos isolados de <i>Streptococcus</i> e gêneros relacionados da água (lagoa e tanques-rede) e superfície dos peixes .....	65

**STREPTOCOCCUS SPP. E AEROMONAS SPP. NA ÁGUA E EM TILÁPIAS DO NILO  
(OREOCHROMIS NILOTICUS) E PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA DE  
PISCICULTURA EM TANQUES-REDE**

**RESUMO** - A criação intensiva de peixes tem se tornado popular, mas a dependência de arraçoamento pode enriquecer o ambiente com nutrientes, comprometendo a qualidade da água e predispondo os peixes a doenças. *Streptococcus* e *Aeromonas* são bactérias que acometem peixe em criações intensivas, podendo ocasionar mortalidade. Nesse sentido, o presente trabalho objetivou avaliar a influência de uma criação de tilápias do nilo em tanques-rede nos parâmetros de qualidade da água e na ocorrência de *Streptococcus* spp. e *Aeromonas* spp. na água e nos peixes em uma lagoa na região Sudeste do Brasil. Foram definidos para as amostragens dois locais, a lagoa, para coleta de água e os tanques-rede, para coleta de água e peixes e dois períodos, seco e chuvoso. Os dados obtidos da qualidade da água foram avaliados por indicadores estabelecidos na Resolução Conama nº 357, para corpos de água doce de classe 2. A presença de *Streptococcus* spp. e *Aeromonas* spp. foi avaliada por identificação fenotípica e a identificação das espécies, por provas bioquímicas. Isolados foram avaliados para produção de hemolisina utilizando ágar sangue e teste de resistência a antimicrobianos conforme o método de difusão de discos. A atividade de criação intensiva de peixes aumentou a concentração de fósforo total da água no período seco, ocorrência de *Streptococcus* spp. no ambiente e a população de *Aeromonas* spp. na superfície dos peixes. No período chuvoso, houve maior isolamento das espécies potencialmente patogênicas, *Aeromonas hydrophila* na superfície e no rim dos peixes, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. jandaei* e *Streptococcus agalactiae* na superfície dos peixes, quando também ocorreu aumento da concentração de N-amoniaco e depleção acentuada da concentração de oxigênio dissolvido na água, e isso pode ter sido a causa da mortalidade de peixes nos tanques-rede. A produção de  $\beta$ -hemólise para aeromonas foi maior para as espécies isoladas da

água e do rim dos peixes, enquanto para estreptococos foi maior para os isolados da superfície dos peixes. As espécies *Aeromonas veronii*, *A. hydrophila*, *A. jandaei*, *A. sobria*, *A. caviae* e *Streptococcus agalactiae* apresentaram resistência intermediária à eritromicina e *Aeromonas veronii* e *Streptococcus agalactiae* também à tetraciclina. Estes resultados podem ser uma advertência contra o uso de terapia antibiótica para controlar as doenças causadas pelo uso de água ou peixe do local.

**Palavras-chave:** Análise microbiológica, antimicrobianos, hemolisina, lagoa, qualidade da água

***Streptococcus* spp. AND *Aeromonas* spp. IN THE WATER AND ON NILE  
TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) AND WATER PHYSICO-CHEMICAL  
PARAMETERS OF NET-CAGE CULTURE**

**ABSTRACT** – Intensive fish farming is becoming more and more popular, but dependency on ration feeding increases nutrient load of the water, affects its quality and predisposes fish to diseases. *Streptococcus* and *Aeromonas* are bacteria that can affect fish in intensive farms and cause mortality. This study aims at evaluating the impact of a Nile tilapia net-cage farm on the water quality parameters and the occurrence of *Streptococcus* spp. and *Aeromonas* spp. in the water and on the fish, in a pond in Southeastern Brazil. Two sampling sites were defined, one in the pond and another in the net cages to collect water, and water and fish, respectively. Sampling took place during two periods, dry and rainy. Water quality data were analyzed according to standards set by Conama resolution nº 357, for freshwater bodies class 2. *Streptococcus* spp. and *Aeromonas* spp. were determined by phenotypic and species identification using biochemical tests. Isolates were evaluated for hemolysin production using blood agar and antimicrobial resistance test according to disk diffusion method. Intensive fish farming increased the amount of phosphorus in water, *Streptococcus* spp. occurrence in the environment and *Aeromonas* spp. population on fish surface as well, during dry periods. During the rainy season, more potentially pathogenic bacteria were isolated such as, *Aeromonas hydrophila* on fish surface and kidneys, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. jandaei* and *Streptococcus agalactiae* on fish surface. An increase of N-ammoniacal was also observed together with severe depletion of dissolved oxygen, which may have caused fish mortality in the net-cages. Production of  $\beta$ -hemolysis was greater for aeromonas species isolated from the water and fish kidneys, while for streptococci it was higher in isolates from fish surface. The species *Aeromonas veronii*, *A. hydrophila*, *A. jandaei*, *A. sobria*, *A. caviae* and *Streptococcus agalactiae* showed intermediate resistance to erythromycin, while *Aeromonas veronii* and *Streptococcus*

*agalactiae* showed resistance to tetracycline. These results might be a warning against the use of antibiotic therapy to control diseases caused by the use of water or fish from the site.

**Keywords:** Antimicrobial, hemolysin, microbiological analysis, pond, water quality



## I. INTRODUÇÃO

No Brasil, a expansão na criação de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) tem como principal causa a introdução da piscicultura intensiva. A desvantagem nesse sistema de criação é a dependência total de arraçoamento que pode levar ao enriquecimento do ambiente aquático com nutrientes, sobretudo fósforo e nitrogênio (GUO et al., 2009).

Em níveis acima do limite que o sistema é capaz de metabolizar, esses nutrientes aceleram o processo de eutrofização, comprometendo a qualidade da água para a atividade de piscicultura (GUO & LI, 2003), ocasionando doenças nos peixes relacionadas ao estresse (MOLINARI et al., 2003).

Das doenças em peixes, a Septicemia Hemorrágica Bacteriana ou BHS é relatada como o maior problema sanitário, podendo ocasionar alta taxa de mortalidade em criação intensiva de peixe e pode ser causada por uma variedade de bactérias (CONROY & CONROY, 2006). As principais bactérias relatadas são espécies de *Aeromonas*, *Streptococcus* e gêneros relacionados, como *Aeromonas hydrophila*, *A. jandaei*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida* e *A. veronii* bt. sobria (AUSTIN et al., 1998; KOZINSKA, 2007) e, *Streptococcus* spp. grupo B e *S. agalactiae* (SALVADOR et al., 2003 e 2005; FIGUEIREDO et al., 2006), *S. ictaluri* (SHEWMAKER et al., 2007), *Lactococcus garvieae* (COLORNI et al., 2003), *S. iniae* e *S. dysgalactiae* (MATA et al., 2004; NOBREGA NETTO, 2009). A septicemia hemorrágica em peixes causada por espécies de *Aeromonas*, é caracterizada pela presença de pequenas lesões superficiais, hemorragias locais, particularmente nas brânquias e opérculos, úlceras, exoftalmia e distensão abdominal. Internamente, pode haver acúmulo de líquido ascítico, anemia e lesões no fígado e rins (AUSTIN & AUSTIN, 1993). Por espécies de *Streptococcus* os principais sinais clínicos relatados, além de exoftalmia bilateral ou unilateral são alterações na coloração da pele, natação errática em movimentos circulares e anorexia (EVANS et al., 2006a; FIGUEIREDO et al., 2006).

Devido à ampla distribuição de *Aeromonas* spp. em vários tipos de ambientes hídricos (WARREN et al., 2004), elas podem representar risco para seres humanos, com feridas, dilacerações ou abrasões na pele (HIRANSUTHIKUL et al., 2005) ou quando a água sem tratamento é usada para bebida (GHENGHESH et al., 2001).

Em seres humanos, há também grande relevância médica para *S. agalactiae* ou *Streptococcus* (grupo B de Lancefield), por causarem sérias infecções caracterizadas por septicemia e meningite em neonatos (EVANS et al., 2009), bacteremia, endocardite, infecções de tecido e pele, e osteomielite em adultos (KAWAMURA et al., 2003). *Streptococcus iniae* podem causar infecções como celulite, endocardite infecciosa, meningite e provável artrite séptica em manipuladores de peixes (FACKLAM et al., 2005).

Na literatura, há poucas informações a respeito das condições ambientais que interferem na presença de *Aeromonas* spp. e *Streptococcus* spp., o que levou esta pesquisa a avaliar, através dos parâmetros físico-químicos da água, se o sistema de criação em tanques-rede causa impacto no ambiente e influencia na presença e variação da população de *Aeromonas* spp. e *Streptococcus* spp. na água e nos peixes e a influência do ambiente na piscicultura.

## II. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Parâmetros ambientais na multiplicação microbiana e saúde dos peixes

A produção mundial da aquicultura de peixes, crustáceos, moluscos, etc., em 2007 foi de 50.329.007 t., sendo que a de tilápias e outros da família *Cichlidae* correspondeu a 2.505.000 t. A aquicultura do Brasil ocupou o 16º lugar no ranking com produção de 289.648 t. (FAO, 2009).

Essa alta produtividade caracterizada no sistema de criação intensiva, pelo monocultivo de espécies, alimentação artificial e elevada densidade de estocagem

(SHOEMAKER et al., 2000), leva ao efeito acumulativo das concentrações de fósforo, nitrogênio e matéria orgânica na água (GUO & LI, 2003). A matéria orgânica sofre decomposição biológica através da ação de bactérias, fungos e outros organismos presentes, consumindo oxigênio e liberando gás carbônico, amônia e diversos nutrientes na água (CHENG et al., 2004). A anoxia nas águas tem como principal causa a perda de animais aquáticos e favorecimento do aumento de organismos anaeróbicos (CORRELL, 1998).

O fósforo é reconhecido como o principal nutriente de efeito negativo introduzido em criação de peixes, por resultar no processo de eutrofização em áreas de tanques-rede e até mesmo em todo o ambiente (GUO et al., 2009).

A Resolução nº 357 do Conama (Brasil, 2005), utiliza em sua classificação para águas classe 2 destinadas à aquicultura, o valor máximo para o fósforo total de até 0,03 mg L<sup>-1</sup>, em ambientes lênticos.

Atividades fisiológicas vitais dos peixes, tal como a respiração, digestão, excreção, alimentação e movimentação, são fortemente influenciadas pela temperatura da água (ALBANEZ & MATOS, 2004). Animais heterotérmicos geralmente possuem ótima faixa de temperatura para o funcionamento de seu organismo, chamada de “conforto térmico”. Para as tilápias, a faixa ideal é de 27 e 32°C, sendo que em temperatura entre 20 a 27°C, o consumo de alimento é reduzido e o crescimento se torna mais lento. Entretanto, abaixo de 20°C, além do crescimento se tornar mais lento, as tilápias apresentam também baixa tolerância ao manuseio e às doenças (KUBITZA, 2000).

Segundo TORRES (1992), os valores ideais de pH para piscicultura são de 7 a 8, aceitáveis de 6 a 9, problemáticos abaixo de 6 e acima de 9. Para ALBANEZ & MATOS (2004), os parâmetros mais importantes que determinam o pH de um corpo d'água são a concentração de sais em solução, que tem íntima relação com as características geológicas (dissolução de rochas) da região e a presença de ácido carbônico, que está relacionada com a decomposição de resíduos orgânicos, ação antropogênica por lançamento de despejos domésticos, industriais e por chuva ácida.

A variação diária do pH no meio está relacionada à alcalinidade da água que se refere ao poder tamponante de acidez. Quanto menor a alcalinidade da água, maior será a variação diária do pH no meio. Águas que apresentam alcalinidade menor que  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$  possuem baixo poder tamponante para a acidez, estando na faixa ideal concentrações entre 20 a  $300 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$  (ALBANEZ & MATOS, 2004). Bactérias nitrificantes também usam bicarbonato e carbonato. Portanto, em alcalinidade inferior a  $20 \text{ mg L}^{-1}$ , o processo de nitrificação é prejudicado (FRANCIS-FLOYD et al., 2005).

Dentre os compostos nitrogenados dissolvidos na água, encontra-se uma forma ionizada,  $\text{NH}_4^+$ , denominada íon amônio, e outra não ionizada,  $\text{NH}_3$ , amplamente conhecida como amônia. As duas formas juntas constituem o N-amoniacal total. Altas concentrações do íon amônio podem influenciar fortemente a dinâmica do oxigênio dissolvido no meio, uma vez que para oxidar  $1,0 \text{ mg}$  do íon amônio são necessários cerca de  $4,3 \text{ mg}$  de oxigênio. Em pH básico, o íon amônio se transforma em amônia não ionizada que pode ser tóxica para peixes (PEREIRA & MERCANTE, 2005).

Valores de amônia não ionizada acima de  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  já são suficientes para induzir toxicidade crônica e levar à diminuição do crescimento e da tolerância dos peixes a doenças (KUBITZA, 1999). POSSANTE et al. (2004) descreveram que as condições ótimas para a manifestação de estreptococose em tilápia são, águas alcalinas (pH acima de 8), salinidade de 0 p.p.m. e temperatura de  $20^\circ\text{C}$ . O mecanismo pelo qual o pH baixo reduz taxas de mortalidade pode ser a redução do estresse dos peixes por meio da redução de amônia tóxica na água.

O nitrito é tóxico para os peixes a níveis tão baixos quanto  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ . O valor máximo permitido para águas classe 2 destinadas à aquicultura é de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  N (BRASIL, 2005). O nitrato, produto final do ciclo do nitrogênio, é considerado inofensivo para os peixes em sistemas naturais e lagoas. Em sistemas fechados, com pouca ou nenhuma troca de água, o acúmulo pode ser prejudicial se for superior a  $250 \text{ mg L}^{-1}$  (FRANCIS-FLOYD et al., 2005). O valor máximo permitido para águas classe 2 destinadas à aquicultura é de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  N (Brasil, 2005).

A transparência de um líquido é a medida da interferência à passagem da luz através do meio, sendo proporcionada também pela presença de partículas em suspensão (MATOS, 2001). Sua principal importância na água é no controle do efeito da luz solar que pode limitar os efeitos da radiação interferindo também na abundância de *Aeromonas* e coliformes fecais na água (MAALEJ et al., 2003).

Outro parâmetro, provavelmente o mais crítico da qualidade da água para a criação de peixes, é a concentração de oxigênio dissolvido, que é influenciada pela temperatura da água. Águas a 15°C podem conter até 10,05 mg de O<sub>2</sub>, enquanto que a 30°C retêm apenas 7,57 mg de O<sub>2</sub> por litro (KUBITZA, 2003). Esse fenômeno físico compromete duplamente a saúde dos peixes porque altas temperaturas da água aumentam as taxas metabólicas, com conseqüente incremento da demanda de oxigênio (FRANCIS-FLOYD, 2003). O valor mínimo para águas classe 2 destinadas à aquicultura é de 5 mg L<sup>-1</sup> (BRASIL, 2005).

Para tilápias, recomenda-se teores de oxigênio dissolvido entre 6 e 8 mg L<sup>-1</sup>, possibilitando uma maior quantidade de peixe por área (MAMAR & CYRINO, 1988). Para piscicultura, a concentração mínima de oxigênio dissolvido deve ser mantida a 4 mg L<sup>-1</sup>. Excessivo estresse e risco de mortalidade ocorrem quando a concentração de oxigênio é reduzida a valores inferiores a 2 mg L<sup>-1</sup> (FRANCIS-FLOYD, 2003; KUBITZA, 2003). EVANS et al. (2003) encontraram taxas de mortalidade significativamente mais altas em tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) (27% e 80%) infectadas com 9,5x10<sup>1</sup> e 7,5x10<sup>2</sup> UFC de *S. agalactiae* quando expostas a taxas subletais de oxigênio dissolvido, enquanto em peixes expostos a níveis aceitáveis não houve mortalidade.

## 2.2. O Gênero *Aeromonas*

O gênero *Aeromonas*, é definido pelo prefixo *aer* (ar, gás) e o sufixo *monas* (unidade). Esse gênero descende da família *Vibrionaceae*. Com base em análise filogenética dos genes rRNA, COLWELL et al. (1986) propuseram colocar *Aeromonas* spp. em uma nova família, *Aeromonadaceae*.

Os membros do gênero *Aeromonas* incluem bacilos curtos 0,3-1,0 µm de diâmetro e 1,0-3,5 µm de comprimento, Gram-negativos. Ocorrem isoladamente ou em pares, em cadeias curtas. Normalmente, móveis que apresentam um único flagelo polar (podem ser formados flagelos peritríquios em meio sólidos em culturas jovens), anaeróbios facultativos. Não requerem NaCl para o crescimento, temperatura ótima de 22-28°C, ubíquos e autóctones de ambientes aquáticos (HOLT et al., 1994). Várias espécies são patogênicas para seres humanos, peixes, anfíbios, bem como outros vertebrados e invertebrados (COLWELL et al., 1986).

Historicamente, o gênero *Aeromonas* foi dividido em dois grupos, um grupo representado pela espécie *A. salmonicida* psicotrófica e imóvel, que geralmente está associada apenas a doenças de peixes e três mesófilas e móveis, associadas a infecções em animais e seres humanos, *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria* (SESHADRI et al., 2006).

Em 2000, o gênero *Aeromonas* já compreendia 14 espécies (*Aeromonas hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. caviae*, *A. media*, *A. eucrenophila*, *A. sobria*, *A. jandaei*, *A. veronii*, *A. schubertii*, *A. trota*, *A. allosaccharophila*, *A. encheleia* e *A. popoffii*), não estando a taxonomia do grupo resolvida (FIGUERAS et al., 2000).

Novas espécies estão sendo descobertas e descritas. MARTÍNEZ-MURCIA et al. (2008) encontraram na água e na pele de peixes ornamentais importados uma nova espécie, propondo o nome *Aeromonas aquariorum* SP. nov. para a cepa MDC47T (= DSM 18362T = 7289T CECT).

A identificação primária de isolados como membros do gênero *Aeromonas* é relativamente simples. Muitos laboratórios são capazes de atribuir classificação para um dos complexos clássicos (*Aeromonas hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria*), mas a identificação para o nível de espécie por meio de testes bioquímicos pode ser problemática, devido às complexidades taxonômicas do gênero (WHO, 2002).

### 2.2.1. *Aeromonas* em água

As *Aeromonas* spp. são microrganismos que possuem ampla distribuição em vários tipos de ambientes hídricos (WARREN et al., 2004), sendo encontradas em águas poluídas e não poluídas (DI BARI et al., 2007; MARTINS et al., 2009), bem como em sistemas de distribuição de água potável em todo o mundo (BRAVO et al., 2005), cloradas (TOKAJIAN & HASHWA, 2004); minerais (SCOARIS et al., 2008) em esgoto bruto e tratado (MONFORT & BALEUX, 1990 e 1991), nos oceanos nas interfaces de água doce e marinha (MONFORT & BALEUX, 1991) e nas águas subterrâneas (DI BARI et al., 2007; SCOARIS et al., 2008).

Ainda não se sabe sobre os mecanismos que conferem a versatilidade metabólica que permite *Aeromonas hydrophila* persistir em habitats aquáticos (incluindo as águas poluídas) ou que facilitam interações ecológicas com outros organismos procariontes e eucariontes (SESHADRI et al., 2006).

Condições adequadas de pH, temperatura e nutrientes, especialmente o fósforo, favorecem a multiplicação de *Aeromonas* spp. em ambientes aquáticos (ARAUJO et al., 1989).

*Aeromonas* não se multiplicam em pH inferior a 4 ou superior a 10. Para *A. hydrophila* o melhor intervalo de pH é de 5,2 a 9,8 (HAZEN et al., 1978). No entanto, o pH básico e alta temperatura combinada de 23°C beneficiam sua multiplicação (MONFORT & BALEUX, 1990), razão por que se usa Água Peptonada Alcalina (APA) (pH 8,5-8,8) como um método de enriquecimento de amostras para recuperação de *Aeromonas* de água quando o número de organismos é baixo (GAVRIEL et al., 1998).

SCHUBERT & MATZINO (1990) observaram que organismos adaptados para temperatura baixa, como *Aeromonas hydrophila*, quando expostos a temperaturas elevadas, multiplicam mais rápido do que quando já adaptados às temperaturas mais altas.

As maiores densidades de *Aeromonas* são encontradas em água durante os meses mais quentes do ano (WARREN et al., 2004). GAVRIEL et al. (1998), verificaram que o isolamento de *Aeromonas* em um sistema de distribuição de água no Nordeste da

Escócia, foi sazonal, com um pico durante o verão, quando a temperatura da água foi maior que 12°C. MONFORT & BALEUX (1991) também verificaram maior abundância no verão em temperatura média da água de 21°C que no inverno em temperatura média da água 6°C em água da lagoa Thau em Languedoc-Roussillon, sul da França.

Há também uma associação entre o padrão de isolamentos de *Aeromonas* com o período da chuva. GAVRIEL et al. (1998) atribuíram que o aumento da pluviosidade aumenta a carga orgânica na água e conseqüentemente a carga microbiana. WARREN et al. (2004) verificaram que a variação espacial e temporal das populações de *Aeromonas* em dois lagos urbanos em Lubbock, Texas revelaram picos maiores na primavera e no verão, quando a atividade humana em torno dos Lagos era maior.

Em ambiente com baixa poluição, *Aeromonas hydrophila* é a espécie que apresenta a melhor sobrevivência/replicação (ARAÚJO et al., 1989) e em águas com contaminação fecal considerável e águas residuais, a espécie mais comum é *Aeromonas caviae* (ARAÚJO et al., 1991).

Em análise de água potável no México, de 70 amostras BRAVO et al. (2005) isolaram o gênero *Aeromonas* em 37 delas, e as espécies identificadas foram *Aeromonas hydrophila* 45,9%, *A. sobria* 18,9%, *A. caviae* 16,2%, *A. jandaei* 13,5%, *A. salmonicida* 2,7% e *A. veronii* 2,7%.

Em uma lagoa de tratamento de esgotos, Sul da França, MONFORT & BALEUX (1990) verificaram que, independentemente da época do ano, *Aeromonas caviae* foi a espécie dominante, predominando principalmente no inverno e *Aeromonas sobria* foi a espécie dominante na primavera no efluente tratado.

Em 2005, após o furacão Katrina em New Orleans, nas áreas inundadas, PRESLEY et al. (2006) encontraram concentrações extremamente altas de bactérias patogênicas em particular *Aeromonas* spp. de  $5,6 \times 10^6$  a  $2,6 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>, onde 50% dos isolados foram *Aeromonas hydrophila* e consideraram que, comparativamente, concentrações de *Aeromonas* spp. em águas poluídas mundialmente giram ao redor de  $10^2$  a  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>.



### 2.2.2. *Aeromonas* em peixes

Várias espécies do gênero *aeromonas* são consideradas agentes etiológicos de numerosas patologias em peixes de interesse em aquicultura, causando significativas perdas econômicas (AUSTIN et al., 1998). É importante observar que essas bactérias compõem também parte da microbiota intestinal normal de peixe saudável, portanto a presença dessas bactérias, por si só, não é indicativo de doença (CIPRIANO, 2001).

Existem várias espécies de *aeromonas* que podem infectar peixes. A primeira é a espécie psicrófila *Aeromonas salmonicida*, que causa a furunculose em salmonídeos, salmão e truta, onde o cultivo é intensivo (AUSTIN & AUSTIN, 1993). *Aeromonas hydrophila* e *A. jandaei* são causadoras de infecções em espécies de peixes cultivados em zonas temperadas como a enguia e o bagre. No entanto, KOZINSKA (2007) verificou na Polônia que a maioria dos isolados de *Aeromonas salmonicida*, *A. bestiarum* e *A. veronii* bt. sobria foram patogênicos tanto para truta como para carpa.

Algumas estirpes de *aeromonas* são mais virulentas, o que significa que elas possuem propriedades especiais que lhes permitem causar graves epidemias. Estirpes endêmicas em uma população de peixes se tornam mais prejudiciais para os novos peixes introduzidos na massa de água, podendo ocorrer grandes perdas desses peixes recém-estocados (FRANCIS-FLOYD, 2009).

As espécies potencialmente patogênicas para peixes de águas tropicais são *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria* e *A. caviae* (MARTINS et al., 2008; SEETHALAKSHMI et al., 2008), *A. veronii* (OROZOVA et al., 2009), *A. jandaei* (SANTOS et al., 1999) e *A. eucrenophila* (SINGH & SANYAL, 1999). Contudo, HIRSCH et al. (2006) consideram que *A. jandaei* e SINGH & SANYAL (1999) que a *A. eucrenophila* possuem potencial patogênico para seres humanos. KOZINSKA (2007) encontrou em fazendas na Polônia, como espécies patogênicas dominantes para carpas, *Aeromonas veronii* bt. sobria, *A. bestiarum* e *A. salmonicida* e para truta arco-íris, a espécie *A. hydrophila*.

Embora tilápias sejam relativamente resistentes a doenças comparadas a outras espécies de peixes, muitos organismos patogênicos podem infectá-las (AL-HARBI & UDDIN, 2005). No Brasil, foram isoladas as espécies, *Aeromonas veronii* biogrupo

sobria, *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae*, *A. trota*, *A. jandaei*, *A. allosaccharophila*, *A. salmonicida*, *A. schubertii*, *A. eucrenophila*, *A. veronii* biog. *veronii*, *A. media* e *Aeromonas* spp. (ESPOSTO et al., 2007; MARTINS et al., 2008).

### 2.2.3. *Aeromonas* em seres humanos

As *Aeromonas* mesófilas estão emergindo como importantes patógenos em seres humanos e com mais frequência aparecem como responsáveis por uma grande variedade de infecções. Aproximadamente 85% dos isolamentos clínicos do gênero correspondem às espécies *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* bv. *sobria* (FIGUEIRAS et al., 2005), incluindo ainda as espécies *Aeromonas veronii* bt. *veronii*, *A. jandaei*, *A. schubertii* e *A. trota* também responsáveis por septicemia em seres humanos (ABBOTT et al., 1994).

*Aeromonas* spp. estão relacionadas a casos de gastroenterite, que normalmente ocorre após a ingestão de água ou alimentos contaminados e com infecção de ferida resultante da exposição à água contaminada (FIGUERAS et al., 2005). Ferimentos como cortes ou queimaduras em contato com águas contaminadas ou a aspiração dessa água após um acidente podem provocar grave infecção séptica por *A. hydrophila* (SCHUBERT & MATZINOU, 1990).

Na Líbia, como em outros países em desenvolvimento, é comum o uso de água sem tratamento obtida de poços e outras fontes, para bebida, higiene e outros propósitos, isso pode representar risco para indivíduos com feridas, dilacerações ou abrasões (GHENGHESH et al., 2001).

VALLY et al. (2004) notificaram que *Aeromonas hydrophila* provocou infecções de pele associadas à exposição à lama, em pacientes que tinham participado de uma competição de “futebol de lama” na Austrália. O campo havia sido irrigado com água de um rio próximo, durante um mês antes da competição.

Após o Tsunami de dezembro de 2004 no sul da Tailândia, HIRANSUTHIKUL et al. (2005) verificaram que de 777 pacientes internados, 515 estavam com infecções de

pele e do tecido mole. De 305 pacientes, foram obtidos 641 isolados bacterianos das feridas infectadas, em que 145 (22,6%) eram espécies de *Aeromonas*.

AUSTIN & AUSTIN (1993) demonstraram que, apesar de *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria* e *A. caviae* incluírem predominantemente isolados clínicos, também estão associadas a peixes.

#### 2.2.4. Virulência de *Aeromonas*

Estudo da patogenicidade bacteriana tem permitido a compreensão de parte das complexas interações entre patógenos e hospedeiros a nível celular e molecular. A variedade de manifestações clínicas observadas e as infecções provocadas por *Aeromonas* reforçam a ideia de que a patogenicidade desse microrganismo é multifatorial, de maneira que múltiplos fatores de virulência podem atuar conjuntamente. Estudos recentes reforçam essa hipótese e acrescentam que a virulência desse gênero é dependente da estirpe bacteriana, da rota de infecção e do animal utilizado como modelo (YU et al., 2005).

Dentre os fatores de virulência conhecidos que podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento da doença, em seres humanos ou em peixes, destacam-se como principais as enterotoxinas citotônicas e hemolisinas (SOLER et al., 2002).

Alguns autores consideram a produção  $\beta$ -hemólise um fator de virulência de espécies de *Aeromonas* (SANTOS et al., 1999; DI BARI et al., 2007). Vários estudos têm correlacionado produção de hemolisina com produção de enterotoxina e patogenicidade (MONFORT & BALEUX, 1990 e 1991; GHENGHESH et al., 2001). Aerolisina e hemolisina são comumente encontradas em isolados de *A. hydrophila* que causam bacteremia (VADIVELU et al., 1995) e produção de hemolisinas está muitas vezes associada às infecções gastrointestinais causadas por *Aeromonas* (KÜHN et al., 1997).

A expressão de genes que codificam a produção de fatores de virulência é influenciada pelas condições ambientais de multiplicação das aeromonas (GONZÁLEZ-

RODRÍGUEZ, 2007). Depois de repetidas subculturas e armazenamento em laboratório, *Aeromonas jandaei* e *A. trola*, reverteram para seu caractere original não hemolítico e de não produção de enterotoxina (WANG et al., 2003).

GONZALEZ-SERRANO et al. (2002) estudaram onze isolados de *Aeromonas hydrophila*, três de *A. veronii* biovar *sobria* (todos de peixes de água doce) e um de *A. hydrophila* de diarreia humana para o potencial de virulência das características hemolíticas, citotóxicas e enterotóxicas. Concluíram que o cultivo a 4°C apresentava mais estirpes e mais fatores de virulência reunidos que as cultivadas a 28°C e 37°C e consideraram que o risco da presença da *A. hydrophila* e *A. veronii* biovar *sobria* em peixes de água doce armazenados sob gelo não deve ser subestimado, pois fatores de virulência são afetados pela temperatura de incubação e nem sempre relacionado com a presença do gene que codifica a produção desses fatores.

SOLER et al. (2002) verificaram que a produção de  $\beta$ -hemólise por isolados de *Aeromonas popoffii* foi claramente dependente da temperatura e do tipo de sangue usado, sendo mais hemolítica para sangue de humanos comparado a sangue de ovinos e a 20°C comparado a 37°C.

SCHUBERT & MATZINO (1990) verificaram que a dose letal em ratos com isolados de *Aeromonas hydrophila* foi mais baixa quando estas foram cultivadas a temperaturas de 10°C comparado às cultivadas a 30°C.

GHENGESH et al. (2001) isolaram de água de poços e outras fontes em Trípoli, Líbia, 382 espécies de *Aeromonas* classificadas como *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria* e *Aeromonas* atípicas. Dessas, 171 foram positivas para a atividade hemolítica, sendo 53%, 49%, 40% e 37% em eritrócitos de humanos, cavalos, ovelhas e camelos, respectivamente. O resultado mostra o potencial enteropatogênico das espécies de *Aeromonas* comumente presentes nessa água.

KOZINSKA (2007) descreveu como o primeiro relato mostrando a patogenicidade de *Aeromonas veronii* bt. *sobria* para a truta arco-íris na Polônia pela atividade hemolítica e proteolítica, e considerou a possibilidade da bactéria anteriormente ter sido identificada como *A. sobria* por Santos et al. (1988).

### 2.2.5. Sensibilidade a agentes antimicrobianos por *Aeromonas*

Apesar do uso disseminado de antibióticos em medicina humana e veterinária, esses compostos receberam pouca atenção como contaminantes de ambientes aquáticos (LÖSCH et al., 2006).

Bactérias desenvolvem resistência por mutações aleatórias nos genes bacterianos ou elas podem adquirir resistência de outra bactéria, sendo que os genes podem ser transferidos entre as células por transformação em que o DNA lançado por uma bactéria é retomado e incorporado no cromossoma da célula hospedeira; pela transdução, que envolve um fago de transferência de DNA para o cromossomo hospedeiro. A principal forma de transferência de resistência aos antibióticos é pela conjugação, que envolve a transferência direta entre as células dos genes que são exercidas por plasmídeo ou transposons conjugativo (HUSS, 2003). O aumento de resistência aos antibióticos cria grave problema com a terapia antibiótica nos seres humanos e outros animais (KO et al., 1996).

Embora *Aeromonas* sejam generalizadas em ecossistemas aquáticos, pouco se sabia sobre os perfis de resistência aos antibióticos de sistemas de água doce até meados de 1980 (CALOMIRIS et al., 1984). Em estudo realizado por KÄMPFER et al. (1999) em lagos de água doce em torno da região de Lubbock, Texas, encontraram que pelo menos 6% dos isolados de *Aeromonas* spp. exibiam resistência para cotrimoxazole, tetraciclina e cerfuroxime, padrões estes comparáveis a outros inquéritos publicados.

GOÑI-URRIZA et al. (2000) verificaram que os perfis de resistência ao ácido nalidíxico para estirpes de *Aeromonas* ambientais de dois rios na Europa, Arga (Espanha) e o Rio Garonne (França), variaram de 72 a 26%, respectivamente, justificando que, a presença de novos padrões de resistência em estirpes de *Aeromonas* de origem ambiental se associa a zonas com elevado impacto humano e a variação na resistência reflete o uso de antibiótico no local. A resistência elevada a quinolona é particularmente preocupante, uma vez que esses antibióticos são os

primeiros da linha de drogas contra infecções produzidas por *Aeromonas*, e alertaram para a provável causa o uso crescente e muitas vezes indiscriminado de antibióticos.

CASTRO-ESCARPULLI et al. (2003) revelaram que quinolona de primeira geração e cefalosporinas de segunda e terceira geração foram as drogas com o melhor efeito antimicrobiano contra *Aeromonas* spp. isoladas de tilápia, (*Oreochromis niloticus*) no México.

TOKAJIAN & HASHWA (2004), analisando *Aeromonas* em água potável de uma rede de distribuição no Líbano, verificaram que todos os isolados foram resistentes à amoxicilina e 92% à cephalexina e todos foram sensíveis à amikacina, canamicina, cloranfenicol e gentamicina.

No Brasil, PEREIRA JÚNIOR et al. (2006) citam que o uso de oxitetraciclina em pisciculturas é amplo, sendo utilizada em tratamentos de infecções bacterianas, profilaxia ou adicionado à ração como promotor de crescimento e observaram que não houve diferença para a concentração inibitória mínima (MIC) de oxitetraciclina para isolados de *Aeromonas hydrophila* obtidos de pescado, água de cultivo e casos de septicemia hemorrágica em peixes; porém de 100 isolados, 14 apresentaram-se resistentes e concluíram que a variação demonstrada pode representar um risco de seleção de linhagens bacterianas resistentes em ambientes aquáticos devido ao uso de oxitetraciclina.

Bactérias do gênero *Aeromonas* são resistentes à ampicilina, com exceção da *Aeromonas trota* (CASTRO-ESCARPULLI, et al., 2003). Razão por que se usa ampicilina como agente seletivo em meios de cultura para isolamento de *Aeromonas* (DI BARI et al., 2007).

### 2.3. O gênero *Streptococcus*

O termo *Streptococcus* foi utilizado pela primeira vez por Billroth em 1874 para descrever um microrganismo com morfologia de cocos dispostos aos pares e em pequenas cadeias isolado de feridas infectadas (GOMES, 2008).

O gênero *Streptococcus* é estreitamente relacionado com cocos Gram positivo, catalase negativo e se exibem em pares ou cadeias na coloração Gram quando crescido em meio líquido, com células esféricas ou ovoides, medindo 0,5-2,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro, imóveis, não formam esporos, anaeróbico facultativo e algumas espécies são encapsuladas. Nutricionalmente requerem meio rico para crescer e algumas vezes 5%  $\text{CO}_2$ . Tem metabolismo fermentativo, produzindo principalmente lactato, mas não gás. Comumente atacam células vermelhas do sangue, com  $\alpha$ -hemólise (colônias esverdeadas) ou  $\beta$ -hemólises (hemólise completa), crescem nas temperaturas de 25-45°C (ótima de 37°C) (HOLT et al., 1994).

As primeiras classificações foram baseadas unicamente na atividade hemolítica e nas reações sorológicas com anticorpos de Lancefield. A utilização do meio ágar sangue, iniciada por Shottmuller e colaboradores em 1903, possibilitou a diferenciação do padrão de hemólise ( $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$  hemolítico) sendo um grande passo na diferenciação dos estreptococos (FACKLAM, 2002). Em 1933, Lancefield desenvolveu uma classificação para os estreptococos baseada nas características antigênicas de um carboidrato da parede celular denominado de carboidrato C e trabalhando com o teste de precipitação utilizou essas diferenças antigênicas para estabelecer 6 grupos (A até E e N) (LANCEFIELD, 1933).

Mais tarde, estranhou-se que estreptococos como o *Streptococcus bovis* e o *S. faecalis* compartilhassem o mesmo grupo de antígenos, pois eram fisiologicamente e taxonomicamente diferentes. A classificação dos estreptococos não podia ser baseada somente no grupamento sorológico, mas também, no critério fisiológico e bioquímico. Grandes alterações na classificação dos estreptococos resultaram de estudos taxonômicos moleculares do gênero. Os enterococos, anteriormente considerados grupo D estreptococos, agora residem no seu gênero (GOMES, 2008).

Nenhum sistema único de classificação é suficiente para a diferenciação desse grupo heterogêneo de organismos (HOLT et al., 1994). Recentes conclusões levaram microbiologistas a questionar os procedimentos de rotina que estão sendo usados para a identificação de *Streptococcus* não-beta-hemolíticos, catalase-negativos, cocos Gram

positivos, concluindo que o crescimento em um caldo contendo 6,5 % NaCl não é um teste discriminativo valioso para separar enterococos de estreptococos (FORTIN et al., 2003). SHEWMAKER et al. (2007) usaram a capacidade de crescimento em 6,5 % de NaCl das estirpes de *Streptococcus iniae* ATCC 29178<sup>T</sup>, *S. canis* ATCC 43496<sup>T</sup>, *S. pyogenes* ATCC 12344<sup>T</sup>, *S. urinalis* CCUG 41590<sup>T</sup>, *S. uberis* ATCC 19436<sup>T</sup>, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* ATCC 43078<sup>T</sup> para separá-los filogeneticamente da espécie *S. ictaluri* isolado de Catfish (*Ictalurus punctatus*), no Mississippi, EUA.

O gênero *Lactococcus* foi criado em 1985 para acomodar microrganismos até então incluídos no gênero *Streptococcus* e que eram conhecidos como “estreptococos do grupo do ácido láctico” e que apresentam características fenotípicas semelhantes às do gênero *Enterococcus*. Dentre as espécies que compõem este gênero, *Lactococcus garvieae* representa a principal espécie responsável por infecções em seres humanos, seguida pelas espécies *Lactococcus lactis* subespécie *lactis* e *Lactococcus lactis* subespécie *cremoris* (TEIXEIRA et al., 2009), além do significado clínico para humanos *Lactococcus garvieae* e *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* são considerados patógenos oportunistas de significado para medicina veterinária (VIANNI & LÁZARO, 2003; DAVIES et al., 2009).

O Gênero *Streptococcus* contém 93 espécies e 17 subespécies. Somente entre os anos 2000 e 2010, 32 novas espécies foram descritas, conforme Euzèby contido no site: [www.bacterio.cict.fr/s/streptococcus.html](http://www.bacterio.cict.fr/s/streptococcus.html).

### 2.3.1. *Streptococcus* e gêneros relacionados em peixes

A estreptococose em peixes foi relatada pela primeira vez em 1957, em truta arco-íris cultivada no Japão (YANONG & FRANCYS-FLOYD, 2006).

Desde então, infecção por estreptococos em peixe é considerada uma patologia reemergente, que afeta uma variedade de peixe de criação e selvagem ao longo do mundo (TORANZO et al., 1993).

Em sistemas de criação intensiva, a septicemia causada por *Streptococcus* spp. tem sido o maior problema (AL-HARBI, 2005), causando severas perdas econômicas



para a aquicultura e indústrias de pescados (EVANS et al., 2006a). Em 1997, já se estimava que as perdas econômicas anuais, devido à infecção por *Streptococcus* spp. em todas as espécies piscícolas cultivadas, podiam superar 150 milhões de dólares no mundo (SHOEMAKER et al., 2000). Estreptococose em peixe pode ser considerada como um complexo de doenças similares causadas por diferentes espécies de *Streptococcus* e gêneros relacionados (TORANZO, 1993).

Esse grupo de bactérias parece não ter nenhuma especificidade de hospedeiro. É capaz de infectar tanto peixe quanto espécies de mamíferos (SHEWMAKER et al., 2007). Classificação de cocos Gram-positivo baseado em hibridização de DNA-DNA mostrou que das diferentes espécies definidas, pelo menos 5 são consideradas como patógenos de peixe, incluindo *Lactococcus garvieae* (syn. *Enterococcus seriolicida*), *Streptococcus iniae* (syn. *S. shiloi*), *Streptococcus agalactiae* (syn. *S. difficile*), *Streptococcus parauberis* (MATA et al., 2004), *Streptococcus phocae* isolado em 1999 (ROMALDE et al., 2008) e SHEWMAKER et al. (2007) propuseram o nome *Streptococcus ictaluri* sp. Nov. como o membro mais recentemente descrito desse gênero em infecções de peixe de aquicultura no Mississippi.

*Streptococcus iniae* foi relatado pela primeira vez em 1976, por causar abscessos subcutâneos em golfinho amazônico de água doce (*Inia geoffrensis*) em aquários em San Francisco e Nova Iorque, EUA (PIER & MADIN, 1976). É um agente patogênico de peixes, capaz de provocar doença invasiva em aquicultura (WEINSTEIN et al., 1997), sendo considerado pela Associação Americana de Tilápia como o mais importante patógeno para essa espécie de peixe (SALVADOR et al., 2003).

NOBREGA NETTO (2009) descreveu dois genótipos distintos de *Streptococcus iniae* atualmente presentes no Brasil, isolado de focos de meningoencefalite e septicemia em criações intensivas de tilápia do nilo no Paraná e Ceará.

*Streptococcus agalactiae* teve origem em mamíferos terrestres e *Streptococcus iniae* originou de mamíferos aquáticos, contudo o potencial de zoonose não foi explorado adequadamente (EVANS et al., 2006b).

*Streptococcus agalactiae*, vulgarmente conhecido como grupo B streptococcus (grupo B de Lancefield, ou GBS), é uma das causas de doença infecciosa de inúmeras espécies animais (EVANS et al., 2008). Foi encontrado em três continentes e em seis países, inclusive no Brasil (EVANS et al., 2006b), isolado por SALVADOR et al. (2005) de encéfalo, fígado, rim, raspado de pele, líquido ascítico e olho de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) doentes cultivadas em sistema de tanque-rede e em viveiros de terra no norte do Paraná, Brasil. FIGUEIREDO et al. (2006) também isolaram *Streptococcus agalactiae* de fragmentos de rins, baço e cérebro de tilápia do nilo em surtos de meningoencefalite em duas pisciculturas em tanques-rede, no estado de Minas Gerais e no Espírito Santo.

Na baía do Kuwait, Golfo Árabe, EVANS et al. (2002) isolaram *Streptococcus agalactiae* de várias espécies de peixes doentes e infectaram experimentalmente tilápia do nilo com isolados, resultando em 100 e 90% mortalidade, sete dias pós-inoculação. No mesmo local, EVANS et al. (2006b) isolaram essa bactéria do músculo epaxial, córtex de rim, baço, e coração de golfinho (*Tursiops truncatus*) morto. Experimentalmente, inocularam os isolados em tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*), ocorrendo 90% de mortalidade.

Para que ocorra infecção em uma espécie de peixe, é necessário que o agente patogênico seja capaz de multiplicar dentro da faixa de temperatura que é ideal para aquela espécie de peixes (TAN et al., 2006). Dos *Streptococcus*, as espécies e gêneros relacionados que são agentes potenciais de zoonose e que causam morte de peixe por estreptococose em água a temperaturas acima de 15°C incluem *Lactococcus garvieae* (syn. *Enterococcus seriolicida*), *Streptococcus iniae* (syn. *S. shilo*), *Streptococcus agalactiae* (syn. *S. difficile*) e *Streptococcus parauberis* e em água fria a temperaturas abaixo de 15°C, a morte é causada por *Vagococcus salmoninarum* e *Carnobacterium piscicola* (MATA et al., 2004).

*Lactococcus garvieae* é o agente etiológico de lactococose, uma doença emergente, com septicemia hemorrágica que afeta muitas espécies de peixes e provoca importantes perdas econômicas na aquicultura marinha e de água doce

(VENDRELL et al., 2006). Relatado pela primeira vez por COLORNI et al. (2003), em peixe selvagem (*Coris aygula*), no mar vermelho, Golfo de Eilat, Israel, em temperatura da água de aproximadamente 25°C e salinidade constante de 40 ppt. Segundo VENDRELL et al. (2006), essa bactéria torna-se problema quando a temperatura da água aumenta acima de 16°C nos meses de verão. Para TAN et al. (2006), esse é um agente patogênico de peixe de águas temperadas, mas não de peixes de água quente, como garoupa, robalo e tilápia.

A estreptococose por *Streptococcus agalactiae* pode ser encontrada em tilápia, durante o verão quando a temperatura da água é superior a 30°C, sendo a temperatura preferencial desse agente patogênico. Em temperatura da água menor que 30°C, a mortalidade associada a esse agente é baixa (TAN et al., 2006).

AMAL et al. (2008) verificaram que o maior número de isolamento de *Streptococcus agalactiae* em tilápia cultivada na Malásia em gaiola foi registrado em peixes entre 150 e 250 gramas e temperatura da água acima de 31°C. SALVADOR et al. (2003) também encontraram maior número de infecções estreptocócicas por *Streptococcus* spp. em tilápia do nilo de criação em tanques-rede no Paraná, Brasil, nos meses com temperaturas mais elevadas e que os valores de oxigênio dissolvido, pH, alcalinidade, nitrito e amônia da água estiveram dentro da normalidade.

*S. iniae* também é uma bactéria indicadora de calor, de água doce, possivelmente de origem nos mamíferos, pois mostra uma extrema variação na tolerância no crescimento em temperatura extrema e as condições ótimas são temperaturas moderadamente quentes, pH neutro e salinidade zero (POSSANTE et al., 2004).

### 2.3.2. *Streptococcus* em seres humanos

Nos Estados Unidos, há registros de infecções por *Streptococcus* em manipuladores de tilápias infectadas. A idade dos pacientes oscilava entre 40 e 80 anos, sendo mais frequentes em mulheres, por estarem em maior contato com alimentos durante seu preparo (ROMANO & MEJÍA, 2003).

Durante o Inverno de 1995–1996 em Ontário, Canadá, ocorreram quatro casos de infecção invasiva por *Streptococcus iniae* (três acompanhadas de celulite e o quarto com endocardite infecciosa, meningite e provável artrite séptica). Todos os pacientes eram de descendência chinesa e tinham como característica comum a manipulação de tilápias vivas ou filés frescos antes do cozimento (WEINSTEIN, 1997).

Os dois primeiros casos de infecções por *Streptococcus iniae* em pacientes chineses ocorreram fora da América do Norte e foram relatadas por LAU et al. (2003), sendo um dos casos como o primeiro reconhecido de osteomielite por *Streptococcus iniae*. Um declínio na função imunológica pode ser importante na patogênese dessa bactéria pois a maioria dos casos relatados é em pessoas idosas (idade média 70 anos, entre 40–81 anos). Há provas claras de que esse agente é capaz não só de causar doenças graves em peixes e golfinhos, mas também de ser transmitido para seres humanos causando infecção.

A maior parte dos pacientes estudados vive no Canadá, Estados Unidos e Europa sendo de procedência asiática, por serem os maiores consumidores de peixes. Esses estudos são de países desenvolvidos, com eficiente assistência médica e preciso diagnóstico, por isso supõe-se que podem existir vários casos não diagnosticados ou com diagnósticos errôneos em países com escasso ou nulo controle sanitário (ROMANO & MEJÍA, 2003).

O diagnóstico de infecção de *Streptococcus iniae* pode ser perdido porque os kits de identificação comercial não o incluem em seus bancos de dados (LAU et al., 2003). *Streptococcus iniae* pode ser confundido com *S. dysgalactiae* subs. *equisimilis* e com *S. uberis* (WEINSTEIN et al., 1997). Portanto a prevalência de infecções de *S. iniae*, especialmente na população asiática, pode ser subestimada (ROMANO & MEJÍA, 2003). Isso impede o desenvolvimento de estratégias efetivas para o controle de doença (TAN et al., 2006). Esse problema pode ser agravado porque médicos que não estão familiarizados com a infecção não questionam o paciente sobre a exposição a peixe.

Há também grande relevância médica para *S. agalactiae* ou *Streptococcus* (grupo B de Lancefield) que podem causar sérias infecções caracterizadas por septicemia e meningite em neonatos (EVANS et al., 2006b) e, bacteremia, endocardite, infecções de tecido e pele, e osteomielitis em adultos (KAWAMURA et al., 2003).

### 2.3.3. Virulência de *Streptococcus*

Nos filtrados de culturas de estreptococos, detectam-se substâncias de natureza tóxica, enzimática e dotada de outras propriedades biológicas. Entre os fatores de virulência relacionados aos *Streptococcus*, têm-se fímbria, toxina eritrogênica, cápsula, proteína M, proteína C, ácidos lipoteicóicos, peptidoglicano, proteases, fator CAMP, estreptolisina, entre outras (FACKLAM, 2002).

A estreptolisina S é uma exotoxina de proteína extracelular, estável ao O<sub>2</sub>, responsável pelo halo de hemólise (lise das hemácias) produzida por estirpes beta-hemolíticas (BORGER et al., 2005). Estudos recentes sugerem que ela é responsável pela morte de parte dos leucócitos que fagocitam o *Streptococcus*. O sistema imune não produz anticorpos contra ela. A estreptolisina O, também é uma hemolisina, mas só é ativa na ausência de oxigênio. Parece contribuir com a virulência do *Streptococcus* porque pode lesar outras células além das hemácias (NIZET, 2002). Hemólise é usada como um guia na medicina clínica para o gerenciamento de pacientes, bem como auxílio para a classificação de bactéria ao nível de espécies (FACKLAM, 2002).

### 2.3.4. Sensibilidade a agentes antimicrobianos por *Streptococcus*

Antibióticos só são eficazes para tratar surto de *Streptococcus* em peixes, se for aplicado no início da doença. Na maioria dos casos, antibióticos orais são ineficazes; pois, peixes infectados têm um apetite reduzido. Devido à falta de diagnóstico, os aquicultores aplicam muitas vezes antibióticos quando a mortalidade aumenta, sem saber a causa da doença, algumas vezes como forma de "medida preventiva", são administrados antibióticos na expectativa de um surto de doença esperado. Isso resultou em um uso intenso de produtos químicos e drogas, levando a consequências

negativas para os produtores devido ao aumento da pressão de seleção de bactérias resistentes e a preocupação dos consumidores com resíduo na carne (TAN et al., 2006).

No Brasil, *Streptococcus agalactiae* isolados por FIGUEIREDO et al. (2006), a partir de surtos de meningoencefalite em tilápia do nilo em produção de alevinos em Minas Gerais e de engorda e abate no Espírito Santo, foram resistentes ao ácido nalidíxico, gentamicina e neomicina. Todas foram sensíveis à amoxicilina, ao cloranfenicol, à eritromicina, à tetraciclina e à sulfonamida. Os mesmos autores citaram que os perfis de sensibilidade das amostras foram similares aos observados por outros pesquisadores em isolados de *S. agalactiae* de peixes cultivados no Kuwait.

Em 2002, KAWAMURA et al. (2003) verificaram que estirpes de *S. agalactiae* isolados de infecções de recém-nascidos e idosos na província de Tottori, Japão, resistentes à maioria das quinolonas.

### III. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

- Avaliar durante dois períodos, seco e chuvoso, parâmetros físico-químicos da água e a presença das bactérias *Aeromonas* spp. e *Streptococcus* spp. em um sistema de criação intensiva de tilápias do nilo em tanques-rede, em uma lagoa localizada no Estado do Espírito Santo, região sudeste do Brasil.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Verificar, através de parâmetros físico-químicos, se o sistema de criação em tanques-rede causa impacto no ambiente ou se atende às exigências estabelecidas na Resolução Conama nº 357, de 17/03/2005, para corpos de água doce de classe 2 e para a atividade de aquicultura.

- Avaliar a influência dos parâmetros físico-químicos na presença e variação da população de *Aeromonas* spp. e *Streptococcus* spp. na água da lagoa, dos tanques-rede e nos peixes.

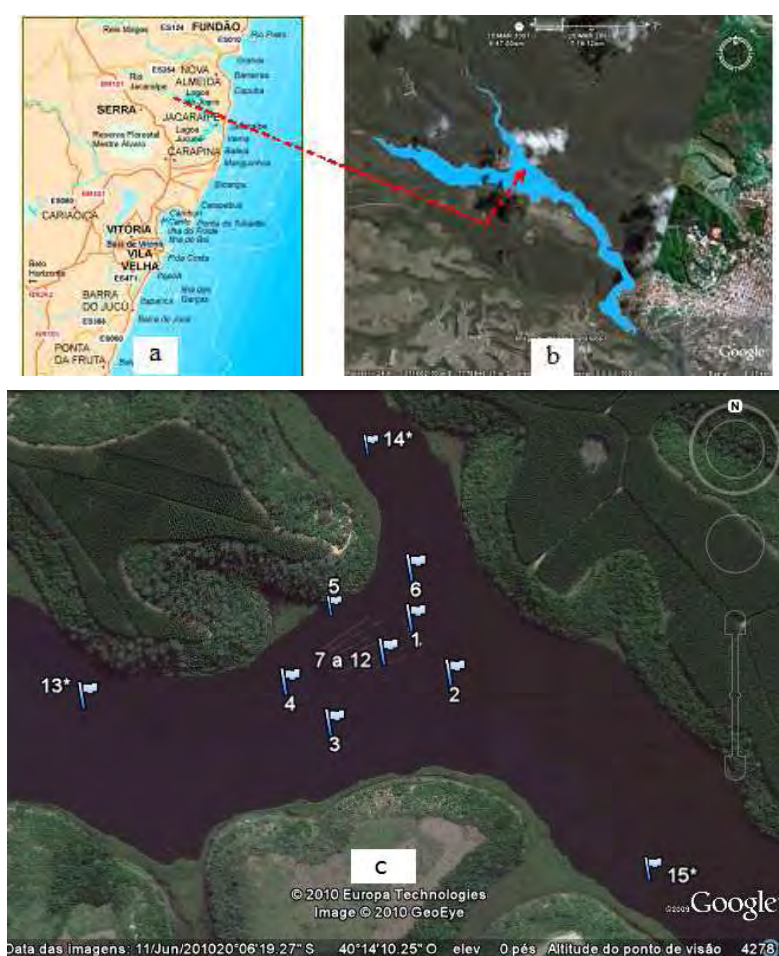
- Definir quando os peixes são capazes de sobreviver na presença desses agentes patogênicos ou quando os parâmetros ambientais quebram esse equilíbrio levando a perdas da produção.

- Determinar a produção de  $\beta$ -hemólise e o nível de resistência a antimicrobianos dos isolados de *Aeromonas* e *Streptococcus*.

## IV. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Localização

O local de estudo refere-se a uma área aquícola da lagoa Juara, pertencente ao complexo lacustre do município da Serra, região da grande Vitória, Estado do Espírito Santo, sudeste do Brasil, latitude 20° 06' e longitude 40° 14', distante 5 km do Oceano Atlântico com aproximadamente 2,8 km<sup>2</sup> de área, 16 km de extensão (Figura 1).



**Figura 1.** Mapa do litoral do Espírito Santo com a localização do município de Jacaraípe onde está situada a Lagoa Juara onde foi conduzido o estudo

a. Mapa do Estado do Espírito Santo, Brasil.

b. Montagem de imagens de satélite obtidas pelo programa Google Earth.

<http://maps.google.com/maps?ll=-20.114011,-40.229739&z=14&t=h&hl=pt-br..>

c. Croqui com pontos de amostragem: 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 13\*, 14\* e 15\* (coleta de água) e 7 a 12 (Tanques-rede = coleta de água e peixe).



No local, era mantida uma criação intensiva de tilápia do nilo (*Oreochomis niloticus*) em 150 tanques-rede. A unidade de criação possuía cinco linhas com 30 tanques de 4 m<sup>3</sup> de volume útil com densidade média de 125 peixes por m<sup>3</sup>, com espaçamento entre linhas de aproximadamente 10 m e entre os tanques-rede de 2 m. A área aquícola onde estavam instalados os tanques-rede apresentava uma profundidade média de 3 m, sem fluxo predominante (Figura 1c).

Os dados climatológicos médios, para o município de Vitória, Espírito Santo, Brasil, foram fornecidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia (Tabela 1).

**Tabela 1.** Dados climatológicos médios, para o município de Vitória, Espírito Santo, Brasil, fornecidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia

Período	T	Po	N	
Seco	abr/08	26,1	55,2	10,0
	mai/08	22,7	36,0	10,0
	jun/08	21,8	47,6	10,0
	jul/08	21,0	21,0	8,0
	ago/08	22,6	30,6	8,0
	set/08	22,4	35,6	11,0
	Média	22,8	<b>37,7</b>	9,5
Chuvoso	out/08	24,5	116,8	14,0
	nov/08	23,8	624,2	26,0
	dez/08	24,9	130,6	16,0
	jan/09	26,1	279,6	16,0
	fev/09	27,1	53,4	9,0
	mar/09	26,6	240,0	18,0
	Média	25,5	<b>240,8</b>	16,5

T = Temperatura média do período (°C)

Po = Precipitação ocorrida no período (mm)

N = Número de dias chuvosos

O clima da região é tropical. Os maiores níveis pluviométricos ocorreram de outubro/08 a março/09. A variação média da temperatura do ar foi de 22,8 a 25,5°C, a precipitação pluviométrica ocorrida foi de 37,7 a 240,8 mm, nos períodos, seco e chuvoso, respectivamente. Constatou-se no mês de novembro a menor temperatura do ar de 23,8°C e a maior precipitação de 624,2 mm.

O trabalho foi dividido em dois períodos, seco (abril a setembro de 2008) e chuvoso (outubro de 2008 a março de 2009). Para cada período, foram disponibilizados seis tanques-rede para estudo e povoados com 500 juvenis de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*), 125 peixes por m<sup>3</sup> (Figura 2).



**Figura 2.** Visão lateral do trecho da Lagoa Juara, município da Serra, ES, Brasil, onde localiza a piscicultura. Foto: outubro de 2007

As rações utilizadas apresentaram três níveis de proteína bruta (PB) mínima de, 32, 28 e 22%, e com teor mínimo de 0,8% a 0,6% para o fósforo total de acordo com a fase de vida dos peixes. O arraçamento era realizado fornecendo de 2% a 4% da biomassa de acordo com a temperatura da água e o consumo, dividindo em uma a duas vezes ao dia.

Dos seis tanques-rede disponibilizados para estudo, no período seco, os peixes foram despescados para a venda no mês de setembro de 2008, e a média do peso dos peixes que foram retirados para análise, variou do mínimo de 445,74 ao máximo de 1045,85 g, com média de 740,71 g, não houve morte significativa de peixes na criação durante o período. No período chuvoso, os peixes foram despescados para a venda no

mês de março de 2009, a média do peso dos peixes que foram retirados para análise, variou do mínimo de 403,82 ao máximo de 954,76 g, com média de 680,27 g e a porcentagem de morte de peixe foi de 15%.

#### 4.2. Coleta das amostras

As amostras foram colhidas mensalmente, de abril a setembro de 2008 (período seco) e de outubro de 2008 a março de 2009 (período chuvoso), entre 07 e 10 horas, padronizando assim as interferências decorrentes do ciclo diário, perfazendo seis coletas por período. As primeiras coletas de cada período foram feitas no início do povoamento dos tanques-rede, com o objetivo de se obter informações para serem comparadas com os dados do respectivo período.

##### 4.2.1. Água

Para avaliar a presença de *Streptococcus* e *Aeromonas* e os parâmetros físico-químicos da água, foram analisadas 400 mL amostras de água da lagoa correspondentes aos pontos de 1 a 6, (seis amostras mensais). A partir do segundo mês de coleta, devido à similaridade dos resultados de análises físico-químicas da água foram estabelecidos mais três pontos de 13\* a 15\* (nove amostras mensais). Para os tanques-rede foram coletadas 400 mL amostras de água referente aos pontos de 7 a 12 (seis amostras mensais) correspondentes aos tanques-rede utilizados para a coleta de peixes (Figura 1c). Totalizando, no período seco, 48 amostras de água da lagoa e 36 de água dos tanques-rede e no período chuvoso, 54 amostras de água da lagoa e 36 de água dos tanques-rede.

Análises de temperatura, transparência e oxigênio dissolvido foram realizadas “*in situ*”. Para análise de pH, alcalinidade, amônio, nitrato, nitrito e fósforo total, as amostras foram colhidas em frascos plásticos de 500 mL, com tampa rosqueada desprovidos de resíduos e para pesquisa de *Streptococcus* spp. e *Aeromonas* spp. em frascos de vidro estéreis.

Os frascos de coleta foram segurados pela base, com a boca para baixo e abaixo 20 cm da superfície da água. Logo após, inclinados lentamente para cima, para permitir a saída do ar e conseqüentemente a entrada de água. Após a retirada dos frascos do corpo de água, era desprezada uma porção da amostra, de 100 mL, em que se deixou um espaço vazio para permitir uma boa homogeneização antes do início da análise. Para análise microbiológica, os frascos foram adicionados de (Na<sub>2</sub>EDTA) (ácido etilenodiaminotetraacético) estéril, (0,3 mL de solução de EDTA a 15%, para cada 100 mL de água a ser coletada) (WHO, 2002; HUNT & RICE, 2005). O Na<sub>2</sub>EDTA é um agente quelante que reduz a toxicidade de possíveis metais, principalmente o cobre que é tóxico para *Aeromonas* em baixas concentrações, como 10 µg L<sup>-1</sup> (WHO, 2002).

Todas as amostras foram identificadas com os respectivos locais de coleta e para o transporte foram acondicionadas em caixas isotérmicas de poliestireno expandido (Isopor®), contendo gelo protegido por sacolas de polietileno, mantidas em temperatura menor que 10°C até o momento da análise.

#### 4.2.2. Peixe

De cada um dos tanques-rede onde foram retiradas amostras de água, pontos de 7 a 12 (Figura 1c), também foram retirados dois peixes utilizando puçá. Esses foram acondicionados em sacos plásticos contendo água do mesmo tanque-rede, identificados e adicionados de oxigênio para o transporte. No primeiro mês de coleta de cada período (abril e outubro), os juvenis foram recolhidos do caminhão no ato da entrega, utilizando a água da embalagem onde se encontravam os peixes, dando o mesmo tratamento descrito anteriormente para o transporte.

Mensalmente, analisaram-se 12 peixes, representados por 12 amostras de água de enxaguadura da superfície dos peixes para pesquisa de *Streptococcus* spp. e *Aeromonas* spp. Para pesquisa de *Streptococcus* spp. em amostras de cérebro e de *Aeromonas* spp. no rim dos peixes, também foram analisados mensalmente 12 peixes, exceto nos meses de abril e outubro. Totalizando para cada período, 72 amostras da superfície, 60 amostras de cérebro e 60 amostras de rim dos peixes.

#### 4.3. Preparo das amostras para análise microbiológica

O preparo das amostras, as contagens e o isolamento dos microrganismos foram realizados no IFES - Instituto Federal do Espírito Santo - Campus de Alegre – Rod. Alegre - Cachoeiro de Itapemirim, Km 47 - CP 47 – Cep: 95.200-000 – Rive – Alegre - ES.

##### 4.3.1. Água de enxaguadura da superfície dos peixes para pesquisa de *Aeromonas* e *Streptococcus*

No laboratório, os peixes foram retirados das sacolas e transferidos para recipientes estéreis de peso conhecido e identificados. Estes foram imersos em caixas de PVC contendo água e gelo na proporção de  $\frac{1}{4}$  do volume da água, (dessensibilização por hipotermia).

O recipiente contendo o peixe foi pesado e adicionado um volume de água peptonada estéril (APE) 0,1%, igual ao peso do peixe (MORALES et al., 2004) e invertendo o recipiente por 25 vezes, de forma a lavar toda a superfície do peixe. O líquido resultante da lavagem foi utilizado para diluições decimais. Nos juvenis, coletados nos meses de abril e outubro de 2008 procedeu apenas a análise da água de enxaguadura da superfície externa, utilizando APE 0,1%, enquanto nos adultos, as amostras foram obtidas a partir da análise da água de enxaguadura da superfície externa e também pelo cérebro e rim.

As diluições foram preparadas retirando-se 1,0 mL do líquido de lavagem de cada amostra de peixe e diluindo em 9,0 mL de APE a 0,1% a mesma temperatura do ambiente (HUNT & RICE, 2005), obtendo-se a diluição  $10^{-1}$ . Diluições subsequentes foram efetuadas, transferindo assepticamente 1,0 mL de cada diluição anterior para 9,0 mL do mesmo diluente, de forma a obter placas com 20 a 200 colônias para contagens de *Aeromonas* e colônias isoladas de *Streptococcus*, diluições de  $10^0$  a  $10^2$ . Antes da retirada do volume transferido, o tubo foi agitado vigorosamente por 15 segundos com auxílio de um agitador tipo “vortex”. Com uma pipeta automática, inoculou-se 0,1 mL de cada diluição na superfície das placas pelo método em superfície (spread plate) e o

inóculo espalhando por toda a superfície do meio, com uma alça de Drigalski, até que o excesso de líquido fosse absorvido.

Para o isolamento de *Streptococcus* foi utilizado o TSA (Himedia), acrescido de 5% de sangue desfibrinado de cavalo (BORGER et al., 2005; EVANS et al., 2006b) suplementado após esterilização com antibiótico (ácido nalidíxico 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (BORGER et al., 2005) e as placas incubadas em aerofilia e em jarras de anaerobiose com atmosfera modificada com 5% de  $\text{CO}_2$  a 37°C por 48 a 96 horas, em estufa bacteriológica. Para contagem e isolamento de *Aeromonas* foram utilizados o ADA (Himedia) (DI BARI et al., 2007) e o ágar seletivo M-Aeromonas base (Havelaar), (Himedia) (TOKAJIAN & HASHWA, 2004; KOZINSKA, 2007) suplementados após esterilização com antibiótico (ampicilina 10  $\mu\text{g/mL}$ ) e as placas incubadas em aerofilia a 28°C por 24 horas, em estufa BOD (WHO, 2002).

#### 4.3.2. Amostra do cérebro para isolamento de *Streptococcus*

Após a obtenção da água de enxaguadura da superfície externa, dentro da capela de fluxo laminar os peixes foram mergulhados em etanol a 70%, flambados e colocados sobre bandeja forrada com papel alumínio e feito um corte em “L” na cabeça e com uma pinça e suabe fragmentos do cérebro foram retirados e transferidos para tubos de ensaio contendo caldo Todd Hewitt, recomendado pelo CDC (SCHRAG et al., 2002) e incubados a 35°C por 6 horas (BORGER et al., 2005), em estufa bacteriológica, e a seguir procedido o plaqueamento por estria em placas contendo TSA (Himedia), acrescido de 5% de sangue desfibrinado de cavalo (BORGER et al., 2005; EVANS et al., 2006b). As placas foram incubadas em aerofilia e em jarras de anaerobiose com atmosfera modificada com 5% de  $\text{CO}_2$  a 37°C por 24 a 96 horas, em estufa bacteriológica.

#### 4.3.3. Amostra do rim dos peixes para isolamento de *Aeromonas*

Após a retirada do cérebro, foi feita uma incisão na porção ventral média do peixe e com um novo suabe foram retirados fragmentos do rim. Os suabes foram

transferidos para tubos de ensaio contendo TSB (Himedia) e incubados a 28°C por 24 horas, em estufa BOD, e a seguir procedido o plaqueamento seletivo por estria, em placas contendo o ágar dextrina-ampicilina (Himedia) (DI BARI et al., 2007) e o ágar seletivo M-Aeromonas base (Havelaar), (Himedia) (TOKAJIAN & HASHWA, 2004; KOZINSKA, 2007) suplementados após esterilização com antibiótico (ampicilina 10 µg/mL). As placas foram incubadas em aerofilia a 28°C por 24 horas, em estufa BOD (WHO, 2002). A bandeja, facas, tesouras e pinças também foram desinfetadas com etanol a 70% e flambadas imediatamente antes do uso.

#### 4.3.4. Amostra de água para a pesquisa de *Aeromonas* e *Streptococcus*

A amostra de água foi homogeneizada manualmente, invertendo o recipiente por 25 vezes. As diluições foram preparadas retirando-se 1,0 mL da amostra e diluindo em 9,0 mL de APE a 0,1% a mesma temperatura do ambiente, obtendo-se a diluição  $10^{-1}$ . Diluições subsequentes foram efetuadas, transferindo asepticamente 1,0 mL de cada diluição anterior para 9,0 mL do mesmo diluente, de forma a obter placas com 20 a 200 colônias para contagens de *Aeromonas* e colônias isoladas de *Streptococcus*, diluições de  $10^0$  a  $10^2$ . Antes da retirada do volume transferido, o tubo foi agitado vigorosamente por 15 segundos com auxílio de um agitador tipo “vortex”. Com uma pipeta automática, inoculou-se 0,1 mL de cada diluição na superfície das placas pelo método em superfície (spread plate) e o inóculo espalhando por toda a superfície do meio, com uma alça de Drigalski, até que o excesso de líquido fosse absorvido.

Para o isolamento de *Streptococcus* foi utilizado o TSA (Himedia), acrescido de 5% de sangue desfibrinado de cavalo (BORGES et al., 2005; EVANS et al., 2006b) suplementado após esterilização com antibiótico (ácido nalidíxico 15 µg mL<sup>-1</sup>) (BORGES et al., 2005) e as placas incubadas em aerofilia e em jarras de anaerobiose com atmosfera modificada com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 48 a 96 horas, em estufa bacteriológica. Para contagem e isolamento de *Aeromonas* foram utilizados o ADA (Himedia) (DI BARI et al., 2007) e o ágar seletivo M-Aeromonas base (Havelaar), (Himedia) (TOKAJIAN & HASHWA, 2004; KOZINSKA, 2007) suplementados após

esterilização com antibiótico (ampicilina 10 µg/mL) e as placas incubadas em aerofilia a 28°C por 24 horas, em estufa BOD (WHO, 2002).

#### 4.4. Isolamento de *Streptococcus* spp. e isolamento e contagem de *Aeromonas* spp.

##### 4.4.1. Isolamento de *Streptococcus* spp.

De cada placa, colônias puntiformes acinzentadas, brancas acinzentadas e brilhantes com halo de  $\beta$  hemólise ou não hemolíticas foram repicadas em TSA, acrescido de 5% de sangue desfibrinado de cavalo e incubadas a 37°C por 48 horas, para a obtenção de cultura pura. Os isolados foram submetidos à coloração de Gram. Colônias que apresentaram cocos isolados, aos pares ou em cadeia e Gram positivos foram transferidas para tubos inclinados com TSA, incubadas a 37°C por 24 horas e realizada a prova da catalase; se negativa nesse teste, foram testadas para crescimento em 6,5% de NaCl. Colônias com cocos Gram positivos, catalase negativas e incapacidade de crescer em 6,5% de NaCl foram consideradas *Streptococcus* spp.

##### 4.4.2. Isolamento e contagem de *Aeromonas* spp.

Para o isolamento do gênero *Aeromonas* foram selecionadas placas com colônias separadas e para contagem do gênero, a melhor diluição, isto é, placas contendo entre 20 e 200 colônias amareladas, circundadas por halo decorrente da hidrólise da dextrina.

Para confirmação bioquímica das colônias isoladas das amostras de rim dos peixes e para o cálculo de UFC mL<sup>-1</sup> das placas de contagem das amostras de água e da superfície corporal dos peixes, três das colônias selecionadas, foram semeadas em TSI (Himedia). Após incubação a 28°C por 18 a 24 horas, as colônias que apresentaram reação ácida tanto na base como no bisel, ou ácida na base e alcalina no bisel, com ou sem formação de gás foram coradas pelo método de Gram, as colônias que se apresentaram na forma de cocos bacilos retos e curtos, aos pares, isolados ou em cadeias curtas e Gram negativas foram repicadas em tubos com TSA (Himedia)



inclinado e incubadas a 28°C por 24 horas. Após o período de incubação, para determinação do gênero foram submetidas às provas de oxidase, catalase e resistência ao agente vibriostático O/129. Colônias que apresentaram oxidase e catalase positivas e resistência ao agente vibriostático O/129 foram consideradas *Aeromonas* spp. (RAHMAN et al., 2002).

**OBS:** Embora a susceptibilidade de O/129 tenha sido um ensaio extremamente útil no passado, na atualidade está sendo duvidosa devido a um número crescente *V. cholerae* estarem se tornando resistentes a este composto pteridine em base global (ABBOTT et al., 1994).

#### 4.5. Expressão do resultado para o gênero *Streptococcus* e *Aeromonas*

Com base nos isolados confirmados bioquimicamente como pertencentes ao gênero *Streptococcus* ou *Aeromonas*, foi determinada a porcentagem sobre o número total de amostra mensal.

Para o cálculo de Unidade Formadora de Colônia por mL de amostra da contagem da população de *Aeromonas* spp. em placas, foi utilizado a **fórmula**:

$$\text{UFC}_{\text{mL}^{-1}} = \frac{N \cdot n}{t \times d}$$

**Em que:**

UFC mL<sup>-1</sup> = Unidade Formadora de Colônia por mL de amostra

N = Número de colônias contadas na placa

n = Número de colônias confirmadas como *Aeromonas* spp.

t = Número de colônias testadas

d = Diluição usada na placa

A identificação dos microrganismos foi realizada no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP) – Campus de Jaboticabal – Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n – Cep: 14.884-900 – Jaboticabal –SP.

#### 4.6. Diferenciação das espécies de *Streptococcus*

Dos isolados caracterizados como *Streptococcus* spp., aproximadamente 20% de cada local foram repicados TSA (Himedia) acrescido de 5% de sangue desfibrinado de cavalo e incubados a 37°C por 18 a 24 h para identificação fenotípica pelo sistema de microtestes API 20 Strep (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France), seguindo instruções do fabricante. Foram considerados apenas os isolados que obtiveram classificação de “identificação aceitável” a “muito boa identificação” pelo software apiweb™ fornecido pelo fabricante. Isolados classificados em diferente taxon como “fraca discriminação” e “identificação incorreta” foram considerados como não identificados. Para validação da metodologia, foi testada uma amostra de referência de *Streptococcus agalactiae* (ATCC 13813) cedida pela FIOCRUZ-RJ.

#### 4.7. Diferenciação das espécies de *Aeromonas*

As colônias caracterizadas como *Aeromonas* spp., isto é, que apresentaram a forma de cocos bacilos retos e curtos, aos pares, isolados ou em cadeias curtas, Gram negativas, oxidase e catalase positivas e resistente ao agente vibriostático O/129 foram comparadas às provas bioquímicas, segundo parte do esquema constante no Bergey's Manual (HOLT et al., 1994), (Tabela 2).

Também foi realizado ensaio de hemólise usando placas contendo TSA (Himedia), acrescido de 5% de sangue desfibrinado de cavalo (MONFORT & BALEUX, 1991; TOKAJIAN & HASHWA, 2004) e incubadas a 28°C por 24 horas, sendo então conferida a atividade hemolítica para o tipo  $\beta$ . Para validação da metodologia de diferenciação parcial das espécies e hemólise, foi testada uma amostra de referência *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966) cedida pela FIOCRUZ-RJ.

**Tabela 2.** Diferenciação das principais espécies *Aeromonas*<sup>b</sup>

Características	<i>A. salmonicida</i>											
	<i>A. caviae</i>	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. media</i>	<i>Subsp. achomogenes</i>	<i>Subsp. masoucida</i>	<i>Subsp. salmonicida</i>	<i>Subsp. smithia</i>	<i>A. schubertii</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>	<i>A. jandaef</i>
Prod. de indol	+	+	+	d	+	+	-	-	-	+	+	+
VM	+	d	+	+	+	+	+	-	+	-	+	ND
V-P	-	-	+	-	-	+	-	-	-	d	+	+
Produção H <sub>2</sub> S	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+
Lisina	-	-	d	-	d	d	d	-	+	+	+	+
Arginina	+	+	+	+	+	+	+	[-]	+	+	-	+
Ornitina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Motilidade	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Gás D-glicose	-	+	+	-	-	+	+	[+]	-	-	+	+
Prod.de ácido:												
D-glicose	+	+	+	+	+	+	+	[+]	+	+	+	+
Lactose	d	-	d	d	-	-	-	-	-	-	-	ND
D-manitol	+	+	+	+	-	+	+	-	-	d	+	+
Rafinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
D-sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	[-]	-	d	-	-
Sacarose	+	d	+	+	+	+	-	d	-	d	+	-
Esculina	+	+	+	d	-	+	+	-	-	-	+	-
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sensibilidade 0/129	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>b</sup> HOLT et al. (1994). Ver Tabela 3.48. Símbolos: + → 90% são positivas, (+) → 80-89% são positivas, d → 21-79% são positivas, (-) → 11-20% são positivas, - → 90% são negativas

<sup>c</sup> CARNAHAN et al. (1991). ND → Não determinado

#### 4.8. Antibiograma

A sensibilidade de estirpes de *Aeromonas* e *Streptococcus* a agentes antimicrobianos foi determinada pelo método de difusão de disco (BAUER et al., 1966), usando ágar Mueller-Hinton.

Alíquotas das culturas isoladas em TSA (Himedia) com 18 a 48 horas de incubação foram transferidas com uma alça bacteriológica, para tubos contendo solução salina a 0,85% até a turvação semelhante à escala 0,5 de Mac Farland, obtendo uma concentração bacteriana final de aproximadamente 10<sup>8</sup> células mL<sup>-1</sup>. As placas com o meio, bem como os discos de antibióticos foram aclimatados na

temperatura ambiente. Um suabe estéril foi embebido na suspensão e retirado o excesso na parede do tubo e feito um esfregaço suavemente em três sentidos diferentes na superfície da placa com o meio.

Dentro do prazo máximo de 15 minutos, utilizando uma pinça estéril, os discos com antibióticos foram distribuídos sobre a superfície do ágar seco contendo a suspensão bacteriana, flambando-se a pinça a cada novo antibiótico e, mantendo-se uma distância de aproximadamente 24 mm entre eles. Os seguintes antibióticos (Laborclin e Sensifar) foram testados. Para *Aeromonas*: Gentamicina (10 µg), ácido nalidíxico (30 µg), tetraciclina (30 µg), ampicilina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), amoxicilina (10 µg), eritromicina (15 µg), levofloxacina (µg) e ofloxacina (10 µg) (GHENGESH et al., 2001; ÁLVAREZ et al., 2004; TOKAJIAN & HASHWA 2004; LIMA et al., 2006). Para *Streptococcus*: Gentamicina (10 µg), ácido nalidíxico (30 µg), tetraciclina (30 µg), ampicilina (10 µg), eritromicina (15 µg), amoxicilina (10 µg), cotrimoxazol (25 µg), penicilina (10 µg), norfloxacina (10 µg), neomicina (30 µg) (EVANS et al., 2002; FIGUEIREDO et al., 2006). Após esses procedimentos, as placas foram incubadas em aerobiose, para as espécies de *Aeromonas* a 28°C em estufa BOD e para *Streptococcus* a 37°C em estufa bacteriológica por 18 a 48 horas. A determinação do grau de sensibilidade bacteriana levou em consideração o diâmetro do halo.

#### 4.9. Parâmetros físico-químicos da água

Temperatura e OD foram determinados “*in situ*” utilizando um oxímetro AT-150 e a transparência foi medida utilizando o Disco de Secchi (30 cm de diâmetro).

O pH foi avaliado em laboratório por potenciometria utilizando um peagâmetro digital (Eletrodo Combinado Universal de Vidro 0 – 14 pH).

A alcalinidade foi determinada por titulação potenciométrica, utilizando ácido sulfúrico 0,02N, como recomendado por GOLTERMAN et al. (1978).

O N-amoniacal ( $N-NH_4^+$  +  $N-NH_3$ ) foi determinado segundo a metodologia descrita por KOROLEFF (1976).

As concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  e de  $\text{N-NO}_2^-$  foram determinadas segundo a metodologia descrita por GOLTERMAN et al. (1978).

O P-total foi determinado com base na metodologia descrita por ANDERSEN (1976).

As análises foram realizadas no Laboratório do Núcleo de Estudos e de Difusão de Tecnologia em Floresta, Recursos Hídricos e Agricultura Sustentável (NEDTEC) - Av. Carlos Lindemberg, s/n - Cep: 29.550-000 - Jerônimo Monteiro - ES. Os dados obtidos foram avaliados por indicadores estabelecidos na Resolução Conama nº 357, de 17/03/2005, para corpos de água doce de classe 2 (BRASIL, 2005).

#### 4.10. Análise Estatística

Para determinar diferenças entre os locais e entre os períodos, foi aplicado o teste de Lilliefors e Testes de Cochran e Bartlett para verificação de normalidade e homogeneidade de variâncias. Devido à distribuição não normal, para os parâmetros físico-químicos, porcentagem de isolamento de *Aeromonas* e *Streptococcus* e população média de *Aeromonas* a análise usada foi a não-paramétrica, Teste de Wilcoxon. Para esta análise, foi utilizado o software SAEG (Universidade Federal de Viçosa, Brasil). As contagens de *Aeromonas* foram transformadas para  $\log_{10}$  (HAZEN et al., 1978).

Qualquer probabilidade estatística, igual ou inferior a 5%, foi considerada significativa.

A porcentagem de isolamento do gênero *Aeromonas* e *Streptococcus* e a população média de *Aeromonas* spp. foi obtida a partir dos isolados confirmados bioquimicamente.

## V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Variação dos parâmetros físico-químicos da água

A Tabela 3 mostra que houve diferença ( $p \leq 0,05$ ) entre os períodos, seco (abril a setembro/08) e chuvoso (outubro/08 a março/09) para todos os parâmetros físico-químicos avaliados, com exceção do pH. Entre os locais, na água da lagoa e dos tanques-rede houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) para a concentração de OD no período chuvoso, N-amoniaco no período seco e o P-total nos dois períodos, com concentrações maiores na água dos tanques-rede, com exceção do OD.

Variações maiores entre os dois períodos demonstraram variação temporal. Menores variações entre os locais são explicadas pela água do ambiente em questão ser classificada como lântico, ou seja, de pouca movimentação (BUENO et al., 2008). ALVES (2006) também encontrou mais variações temporais que espaciais em seu estudo sobre impacto de piscicultura em tanques-rede do Reservatório de Nova Avanhandava, Rio Tietê, São Paulo.

Maior diferença ( $p \leq 0,05$ ) para o N-amoniaco no período seco e P-total, nos dois períodos, na água dos tanques-rede em relação à água da lagoa pode ser devido principalmente a sobra de ração que apresenta nitrogênio e fósforo em sua formulação e segundo GUO & LI (2003), mais de 85% desses nutrientes da alimentação vai para a área de criação dos tanques-rede. Excretas dos peixes, crescimento de algas e outros organismos também podem causar colmatação das malhas dos tanques-rede, e em ambiente represado a concentração desses nutrientes é maior (GUO et al., 2009). BUENO et al. (2008) verificaram maior concentração de P-total nos pontos próximos aos tanques-rede e GUO & LI (2003) e GUO et al. (2009) também verificaram valores maiores para o nitrogênio total e P-total perto dos tanques-rede, sem nenhuma alteração significativa a 50 e 100 m dos tanques.

**Tabela 3.** Valores médios dos parâmetros físico-químicos na água da lagoa e dos tanques-rede nos períodos, seco (abr a set/08), chuvoso (out/08 a mar/09) e o padrão do CONAMA para as águas doces de classe 2

Parâmetros	Período**	Local*		Padrão CONAMA*
		Lagoa	Tanque	
Temperatura (°C)	seco	24,8 <sup>A</sup>	25,1 <sup>A</sup>	...
	chuvoso	27,6 <sup>B</sup>	27,9 <sup>B</sup>	
OD (mg L <sup>-1</sup> )	seco	7,0 <sup>A</sup>	6,5 <sup>A</sup>	Não inferior a 5 mg L <sup>-1</sup>
	chuvoso	4,6 <sup>Ba</sup>	3,8 <sup>Bb</sup>	
pH	seco	7,1	7,1	6 a 9
	chuvoso	7,0	7,1	
Alcalinidade (mg L <sup>-1</sup> )	seco	27,8 <sup>A</sup>	28,4 <sup>A</sup>	...
	chuvoso	24,9 <sup>B</sup>	24,3 <sup>B</sup>	
Transparência (cm)	seco	61,5 <sup>A</sup>	53,9 <sup>A</sup>	...
	chuvoso	51,6 <sup>B</sup>	48,7 <sup>B</sup>	
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	seco	0,007 <sup>A</sup>	0,0083 <sup>A</sup>	1 mg L <sup>-1</sup> N
	chuvoso	0,0029 <sup>B</sup>	0,0033 <sup>B</sup>	
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	seco	0,1248 <sup>A</sup>	0,1577 <sup>A</sup>	10 mg L <sup>-1</sup> N
	chuvoso	0,0537 <sup>B</sup>	0,0529 <sup>B</sup>	
N-Amoniacal (mg L <sup>-1</sup> )	seco	0,2022 <sup>Aa</sup>	0,2316 <sup>Ab</sup>	3,7 mg L <sup>-1</sup> N, para pH ≤ 7,5
	chuvoso	0,3024 <sup>B</sup>	0,3231 <sup>B</sup>	
P-Total (mg L <sup>-1</sup> )	seco	0,0678 <sup>Aa</sup>	0,0881 <sup>Ab</sup>	Até 0,03 mg L <sup>-1</sup> , em ambientes lênticos
	chuvoso	0,0223 <sup>Ba</sup>	0,0287 <sup>Bb</sup>	

\* Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, para as águas doces de classe 2 (BRASIL, 2005)

\*\* Médias seguidas de letra maiúscula diferente, em cada coluna, para o mesmo parâmetro, são estatisticamente diferentes, a 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ )

\* Médias seguidas de letra minúscula diferente, em cada linha, são estatisticamente diferentes, a 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ )

Variações maiores entre os dois períodos demonstraram variação temporal. Menores variações entre os locais são explicadas pela água do ambiente em questão ser classificada como lântico, ou seja, de pouca movimentação (BUENO et al., 2008). ALVES (2006) também encontrou mais variações temporais que espaciais em seu estudo sobre impacto de piscicultura em tanques-rede do Reservatório de Nova Avanhandava, Rio Tietê, São Paulo.

Maior diferença ( $p \leq 0,05$ ) para o N-amoniaco no período seco e P-total, nos dois períodos, na água dos tanques-rede em relação à água da lagoa pode ser devido, principalmente, à sobra de ração que apresenta nitrogênio e fósforo em sua formulação e segundo GUO & LI (2003), mais de 85% desses nutrientes da alimentação vai para a área de criação dos tanques-rede. Excretas dos peixes, crescimento de algas e outros organismos também podem causar colmatação das malhas dos tanques-rede, e em ambiente represado a concentração desses nutrientes é maior (GUO et al., 2009). BUENO et al. (2008) verificaram maior concentração de P-total nos pontos próximos aos tanques-rede e GUO & LI (2003) e GUO et al. (2009) também verificaram valores maiores para o nitrogênio total e P-total perto dos tanques-rede, sem nenhuma alteração significativa a 50 e 100 m dos tanques.

A menor concentração de N-amoniaco ( $p \leq 0,05$ ) e maior concentração do P-total ( $p \leq 0,05$ ) no período seco estão relacionadas à reduzida precipitação média no período de 37,7 mm contra 240,0 mm no período chuvoso (Tabela 1). A baixa precipitação no período seco aumentou a concentração do P-total na água da lagoa e tanques-rede, contribuindo para o crescimento excessivo de macrófitas, principalmente "taboa" (*Typha domingensis*) nas margens, durante o período. No período chuvoso, com elevação do nível das águas, parte dessa vegetação foi coberta pela água e desprendida das margens, o que pode aumentar a quantidade de matéria orgânica no sistema, e conseqüente decomposição desse material por organismos aeróbicos. Segundo ALVES (2006), é possível que o maior *input* de matéria orgânica na água e a degradação desse material por bactérias levem ao consumo de oxigênio. A decomposição do excedente de matéria orgânica submersa no período chuvoso contribuiu para a redução da



transparência, aliada a temperaturas mais altas, média de 27,9°C pode ter sido a causa da depleção do OD na água (CORRELL, 1998), como consequência pode ter ocorrido diminuição do processo de nitrificação e dessa forma houve aumento na concentração de N-amoniaco.

A amônia é um metabolito proveniente da excreção nitrogenada dos peixes e outros organismos aquáticos e da decomposição microbiana de resíduos orgânicos (KUBITZA, 2000). A presença do íon amônio nos ambientes aquáticos caracteriza poluição recente por resíduos orgânicos, sua conversão a nitrito e depois a nitrato consome OD, alterando as condições bioquímicas do sistema aquático (MARTINS, 2005). Alterações na concentração de OD podem originar-se de mudanças bruscas na temperatura da água, bem como de processos físico-químicos, químicos e bioquímicos (oxidação aeróbica de substâncias orgânicas) (MARQUES, 1993).

Esses valores são referentes às médias de leituras no período diurno entre nove e dez horas da manhã e, segundo MERCANTE et al. (2005), provavelmente, durante a noite, a concentração de OD diminua consideravelmente em função da respiração do fitoplâncton.

Alta concentração de nitrato pode ser devido ao lançamento de esgoto doméstico clandestino no curso d'água (ALVES et al., 2008). Em decorrência da existência de vegetação ciliar na lagoa estudada, provavelmente não há significativo aporte desse nutriente por lixiviação e, portanto, o  $\text{N-NO}_3^-$  produzido pode ter sido diluído pela cheia no período (240,8 mm) ou assimilado pela vegetação e plâncton, o que justifica menores concentrações ( $p \leq 0,05$ ) no período chuvoso, segundo HARGREAVES (1998), concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  em lagoas de aquicultura em regiões temperadas são máximas durante o inverno, quando a florescência de fitoplâncton é mínima.

As menores concentrações de  $\text{N-NO}_2^-$  e  $\text{N-NO}_3^-$ , no período chuvoso ( $p \leq 0,05$ ), pode ser devido à diluição, à assimilação pela vegetação e plâncton e à diminuição do processo de nitrificação que demanda oxigênio, conforme discutido anteriormente.

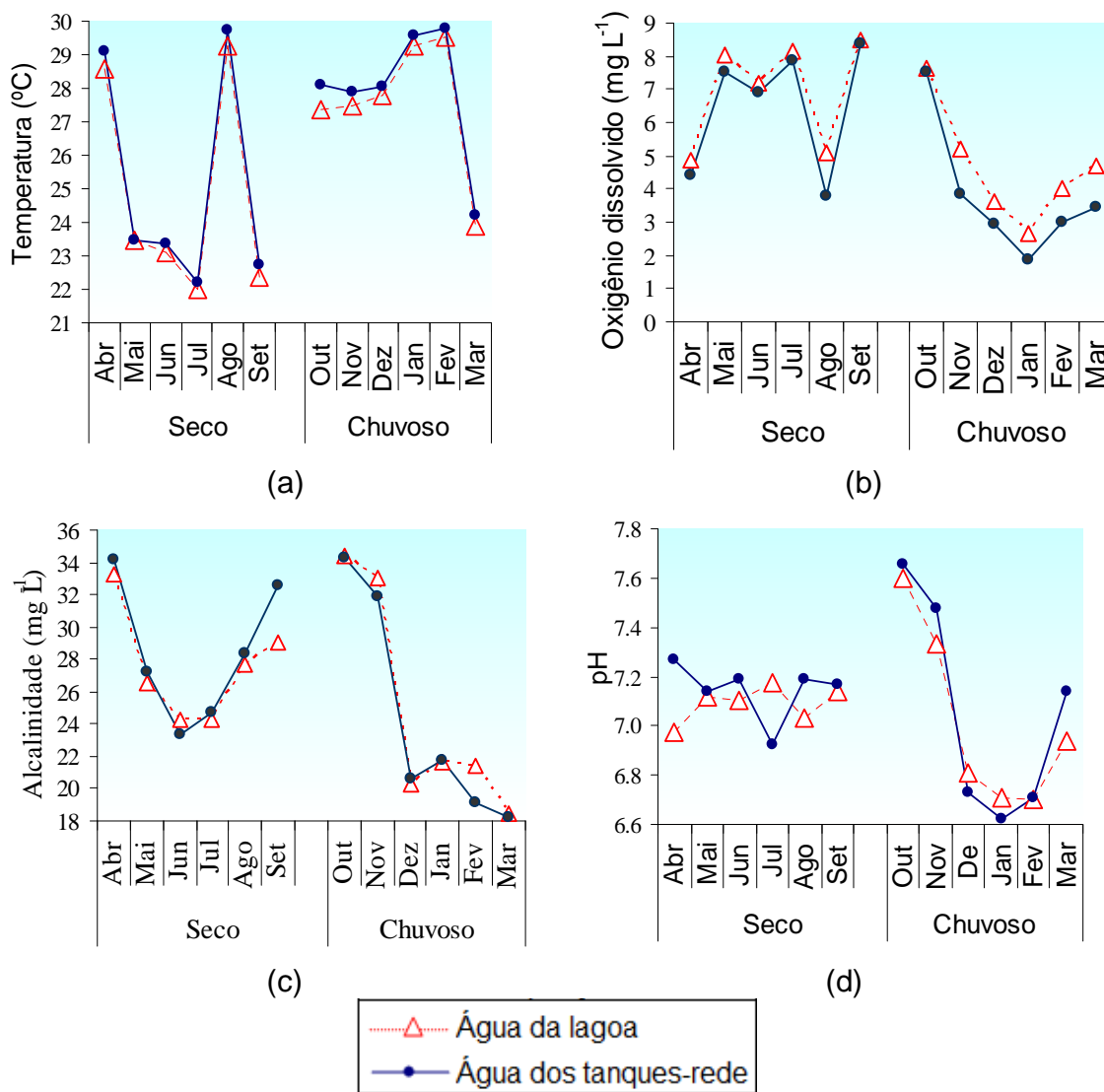
Para o P-total, as menores concentrações ( $p \leq 0,05$ ), no período chuvoso, podem ser explicadas pela existência de vegetação ciliar na lagoa e, provavelmente não ocorre significativo aporte de nutriente por lixiviação. Assim, pode ter ocorrido diluição do P-total pela cheia ou sua assimilação por alguma vegetação ou por adsorção do sedimento (CORRELL, 1998). Outros fatores bióticos e abióticos estão envolvidos na dinâmica do fósforo no ecossistema aquático (BUENO et al., 2008).

A diluição das águas no período chuvoso também pode ter reduzido os valores da alcalinidade, o que justifica a diferença ( $p \leq 0,05$ ) menor para a água da lagoa de  $24,9 \text{ mg L}^{-1}$  e água dos tanques-rede de  $24,3 \text{ mg L}^{-1}$ .

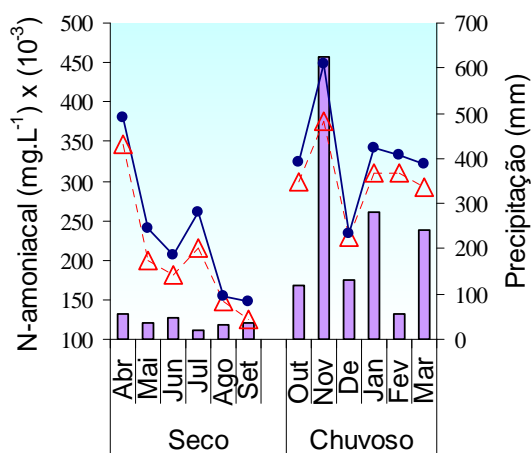
Os valores médios mensais dos parâmetros físico-químicos da água da lagoa e da água dos tanques-rede nos períodos seco (abril a setembro/08) e chuvoso (outubro/08 a março/09) encontram-se na Figura 3.

A temperatura variou no período seco, sendo registrada mínima de  $21,99^\circ\text{C}$  em julho na água da lagoa e máxima de  $29,76^\circ\text{C}$  em agosto na água dos tanques-rede. No período chuvoso, variou de  $23,88^\circ\text{C}$  em março na água da lagoa ao máximo de  $29,78^\circ\text{C}$  em fevereiro na água dos tanques-rede (Figura 3a). Essas variações sazonais correspondem aos meses mais frios e quentes de cada período avaliado. No período seco, nos meses de maio, junho, julho e setembro e no período chuvoso, no mês de março a temperatura ficou abaixo da faixa de conforto térmico para tilápias que é de  $27$  a  $32^\circ\text{C}$  (KUBITZA, 2000).

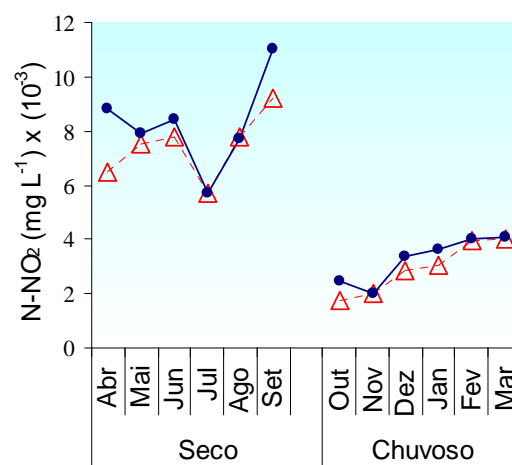
As concentrações médias de OD, no período chuvoso, foram de  $4,6 \text{ mg L}^{-1}$ , para a água da lagoa e de  $3,8 \text{ mg L}^{-1}$  na água dos tanques-rede com o mínimo de  $1,85 \text{ mg L}^{-1}$  em janeiro (Figura 3b), sendo verificadas três ocorrências no período seco contra nove no período chuvoso de valores abaixo do estabelecido pela legislação (BRASIL, 2005) e de quatro ocorrências no período seco, contra dez no período chuvoso, abaixo da considerada ideal em sistemas de criação intensiva de tilápia do nilo, de  $6,0 \text{ mg L}^{-1}$  (WELKER et al., 2007), coincidindo com o registro de mortalidade de peixes de 15%.



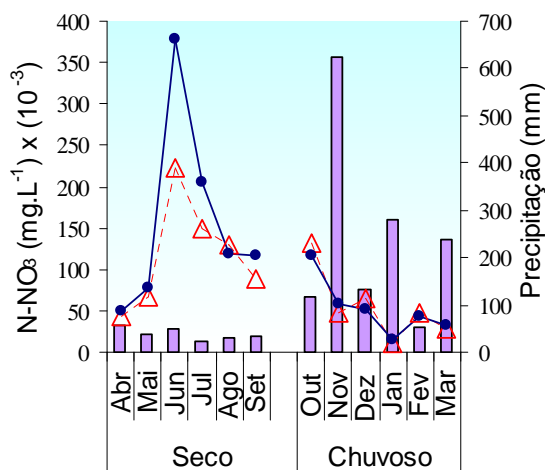
**Figura 3.** Valores médios mensais dos parâmetros físico-químicos da água da lagoa e dos tanques-rede nos períodos, seco e chuvoso. Temperatura (a), OD (b), alcalinidade (c), pH (d)



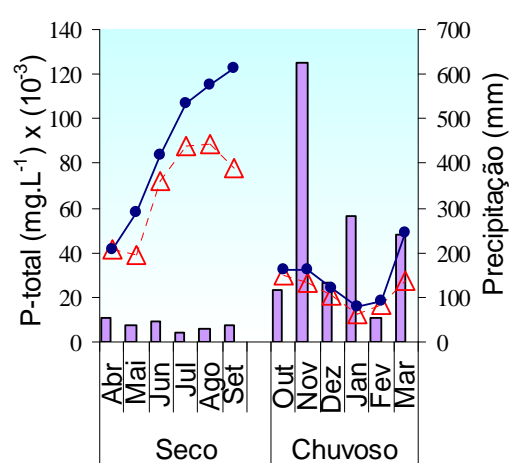
(e)



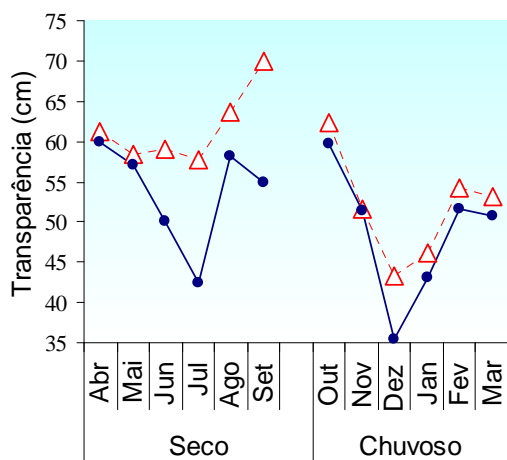
(f)



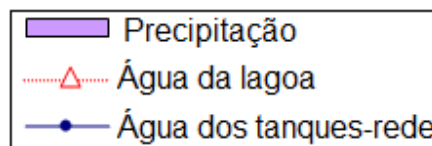
(g)



(h)



(i)



**Continuação da Figura 3.** Valores médios mensais dos parâmetros físico-químicos da água da lagoa e dos tanques-rede nos períodos, seco e chuvoso. N-amoniaco (e), N-NO<sub>2</sub> (f), N-NO<sub>3</sub> (g), P-total (h) e transparência (i)

Os valores de alcalinidade (Figura 3c) variaram do mínimo de 18,18 mg L<sup>-1</sup> em março ao máximo de 34,44 mg L<sup>-1</sup> em outubro, com três ocorrências de valores abaixo de 20 mg L<sup>-1</sup>, isto é, abaixo da concentração considerada suficiente para bom poder tamponante, entre 20 a 300 mg L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub> (ALBANEZ & MATOS, 2004) e da ideal para as bactérias nitrificantes, que é superior a 20 mg L<sup>-1</sup> (FRANCIS-FLOYD et al. 2005). Não foi verificada diferença significativa para o pH nas águas entre os locais e nem entre os períodos (p≥0,05). O pH mínimo foi de 6,6 em janeiro e o máximo de 7,65 em outubro (Figura 3d), esses valores estão próximos ou pouco acima de 7,0. Portanto, a alcalinidade manteve o pH sem grandes alterações, estando os valores dentro dos limites estabelecidos pela Resolução Conama nº 357/2005 (Tabela 3) e para a piscicultura, em que o pH ideal é na faixa de 7,0 a 8,5 (ALBANEZ & MATOS, 2004), águas alcalinas com pH maior que oito propiciam condições ideais para a ocorrência de infecções em peixes por potencializarem a toxidez da amônia (PEREIRA & MERCANTE, 2005).

As concentrações médias de N-amoniacal foram maiores no período chuvoso, de 0,302 mg L<sup>-1</sup> para a água da lagoa e de 0,323 mg L<sup>-1</sup> para a água dos tanques-rede (Tabela 3), com o valor máximo de 0,450 mg L<sup>-1</sup> na água dos tanques-rede em novembro (Figura 3e), esses valores ficaram abaixo do estabelecido pela legislação (BRASIL, 2005), para corpos de água doce de classe 2 de no máximo 3,7 mg L<sup>-1</sup> para água com pH≤7,5.

A transformação do íon amônio (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) em amônia (N-NH<sub>3</sub> livre, gasoso), que pode ser tóxica para os peixes é dependente da temperatura e pH (HARGREAVES, 1998). No presente estudo, para cálculo da forma não ionizada da amônia (N-NH<sub>3</sub>), foi utilizada a tabela de conversão (FRANCIS-FLOYD et al., 2005), considerando a concentração máxima de N-amoniacal de 0,450 mg L<sup>-1</sup> no mês de novembro na água dos tanques-rede (Figura 3e), quando o valor de pH estava em 7,48 (Figura 3d) e a temperatura em 27,87°C (Figura 3a). Dessa forma, o resultado para a concentração máxima de N-NH<sub>3</sub> no período do estudo foi de 0,012 mg L<sup>-1</sup> na água dos tanques-rede em novembro, estando esse valor abaixo do que pode ser considerado problema para a

piscicultura, que é superior a  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$  (HARGREAVES, 1998; EL-SHAFI et al., 2004; FRANCIS-FLOYD, et al., 2005).

A concentração média de  $\text{N-NO}_2^-$  nos períodos estudados variou de  $0,0083 \text{ mg L}^{-1}$  no período seco a  $0,0029 \text{ mg L}^{-1}$  no período chuvoso (Tabela 3), com concentração máxima de  $0,011 \text{ mg L}^{-1}$  em setembro (Figura 3f), estando abaixo de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  que é considerada segura para criação de peixes (FRANCIS-FLOYD et al., 2005) e do estabelecido pela legislação para corpos de água doce de classe 2 que é de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  (BRASIL, 2005).

O nitrato, produto final do ciclo do nitrogênio, é considerado inofensivo para os peixes em sistemas naturais e lagoas. Em sistemas fechados, com pouca ou nenhuma troca de água, o acúmulo pode ser prejudicial se for superior a  $250 \text{ mg L}^{-1}$  (FRANCIS-FLOYD et al., 2005). A concentração de  $\text{N-NO}_3^-$  foi significativamente maior ( $p \leq 0,05$ ), de  $0,1577 \text{ mg L}^{-1}$  no período seco contra  $0,0529 \text{ mg L}^{-1}$  no período chuvoso (Tabela 3), com concentração máxima de  $0,38 \text{ mg L}^{-1}$  em julho (Figura 3g), estando, portanto, abaixo do considerado tóxico para peixes e abaixo do estabelecido para corpos de água doce de classe 2, que é de no máximo  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  (BRASIL, 2005).

Para o P-total, no período seco, as concentrações médias de  $0,068 \text{ mg L}^{-1}$  na água da lagoa e de  $0,088 \text{ mg L}^{-1}$  nos tanques-rede (Tabela 3) ficaram acima do estabelecido para corpos de água doce de classe 2 ( $0,03 \text{ mg L}^{-1}$ ) (BRASIL, 2005). No período chuvoso, as médias foram menores, porém, próximas ao mínimo permitido pela legislação. Essa menor concentração pode estar relacionada à diluição das águas pela cheia.

A diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) para média da transparência pelo disco de Secchi, de  $61,5 \text{ cm}$  no período seco e de  $48,7 \text{ cm}$  no período chuvoso (Tabela 3), com valor mínimo de  $35,5 \text{ cm}$  em dezembro e máxima de  $61,16 \text{ cm}$  em abril, na água dos tanques-rede (Figura 3i), está na faixa considerada ideal para a aquicultura, de  $20$  a  $60 \text{ cm}$  (MÄMAR & CYRINO, 1988). O menor valor encontrado no período chuvoso pode

ser explicado pela possível presença de maior quantidade de matéria orgânica oriunda da decomposição de parte da vegetação que ficou submersa no período.

## 5.2. Ocorrência de *Aeromonas* spp e *Streptococcus* spp. e população média de *Aeromonas* spp.

As diferenças, nos locais analisados, entre a ocorrência e população média de *Aeromonas* spp e ocorrência de *Streptococcus* spp. nos períodos seco (abril a setembro/08) e chuvoso (outubro/08 a março/09) encontram-se na Tabela 4.

**Tabela 4.** Ocorrência de *Aeromonas* spp. e *Streptococcus* spp. e população média de *Aeromonas* spp. na água da lagoa, tanques-rede, superfície, rim e cérebro dos peixes nos períodos seco (abr a set/08) e chuvoso (out/08 a mar/09)

Bactérias	Amostras	Período <sup>••</sup>	Local <sup>*</sup>				
			Água		Peixes		
			Lagoa	Tanques-rede	Superfície	Rim	Cérebro
<i>Streptococcus</i> spp.	(Analisadas/Positivas) Isolamento (%)	Seco	(48/20) 42 <sup>Aa</sup>	(36/17) 47 <sup>Aa</sup>	(72/41) 57 <sup>Ab</sup>	-	(60/0) 0
		Chuvoso	(54/8) 15 <sup>Ba</sup>	(36/10) 28 <sup>Bb</sup>	(72/23) 32 <sup>Bb</sup>	-	(60/0) 0
<i>Aeromonas</i> spp.	(Analisadas/Positivas) Isolamento (%)	Seco	(48/30) 63 <sup>Aa</sup>	(36/27) 75 <sup>b</sup>	(72/60) 83 <sup>b</sup>	(60/6) 10 <sup>Ac</sup>	-
		Chuvoso	(54/23) 43 <sup>Ba</sup>	(36/25) 69 <sup>b</sup>	(72/55) 78 <sup>b</sup>	(60/10) 17 <sup>Bc</sup>	-
<i>Aeromonas</i> spp.	População média (UFC mL <sup>-1</sup> )	Seco	2,35x10 <sup>2a</sup>	2,80x10 <sup>2a</sup>	6,82x10 <sup>2Ab</sup>	-	-
		Chuvoso	1,77x10 <sup>2a</sup>	2,46x10 <sup>2ab</sup>	3,14x10 <sup>2Bb</sup>	-	-

•• Médias seguidas de letra maiúscula diferente, em cada coluna, para cada dois períodos são estatisticamente diferentes, a 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ )

\* Médias seguidas de letra minúscula diferente, em cada linha, são estatisticamente diferentes, a 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ )

Houve diferença ( $p \leq 0,05$ ) nos locais e nos períodos para isolamento de *Aeromonas* spp. e *Streptococcus* spp.

Entre os períodos, no período seco, a ocorrência de *Aeromonas* spp. foi maior ( $p \leq 0,05$ ) na água da lagoa, em 63% das amostras analisadas e a população foi maior na superfície dos peixes de  $6,8 \times 10^2$  UFC mL<sup>-1</sup>. No período chuvoso, a ocorrência de *Aeromonas* spp. foi maior ( $p \leq 0,05$ ) no rim dos peixes em 17% das amostras analisadas. A ocorrência de *Streptococcus* spp. foi maior ( $p \leq 0,05$ ) no período seco, em 42% das amostras de água da lagoa, 47% dos tanques-rede e 57% da superfície dos peixes.

Entre os locais, as diferenças ( $p \leq 0,05$ ) na ocorrência de *Aeromonas* spp., nos dois períodos, foi: rim < água da lagoa < água dos tanques-rede = superfície dos peixes e para *Streptococcus* spp., no período seco foi: água da lagoa = água dos tanques-rede < superfície dos peixes, e no período chuvoso: água da lagoa < água dos tanques-rede = superfície dos peixes. Bactérias do gênero *Streptococcus* spp. não foram encontradas nas amostras de cérebro dos peixes.

Para a população média de *Aeromonas* spp., a diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) no período seco foi: água da lagoa = água dos tanques-rede < superfície dos peixes, e no período chuvoso, não houve diferença significativa ( $p \geq 0,05$ ) na comparação entre as amostras da água dos tanques-rede e da água da lagoa e da superfície dos peixes, porém a população de *Aeromonas* spp. foi significativamente maior ( $p \leq 0,05$ ) na superfície dos peixes comparada à água da lagoa.

Entre os períodos, a diferença maior ( $p \leq 0,05$ ) no período seco, para a porcentagem de isolamento *Aeromonas* spp. e *Streptococcus* spp. na água da lagoa, está relacionada à baixa precipitação de 37,7 mm (Tabela 1) e ao aumento da concentração de P-total nas águas no período (Tabela 3), isso pode ter favorecido a multiplicação dessas bactérias. O fósforo favorece a multiplicação de *Aeromonas* spp. em ambientes aquáticos (ARAUJO et al., 1989). Esse elemento mineral é essencial para todas as formas de vida. Enzimas extracelulares hidrolisam formas orgânicas de fosfatos, o ortofosfato é a única forma do fósforo que os organismos autotróficos



assimilam e o resultado da produção excessiva é a eutrofização. Essa alta produtividade leva ao aumento de populações bacterianas (CORRELL, 1998).

No período chuvoso, o menor número ( $p \leq 0,05$ ) de amostras positivas para *Aeromonas* spp. e *Streptococcus* spp. na água da lagoa pode ser atribuída à diluição das águas e também ao efeito da radiação solar, mesmo em menor transparência ( $p \leq 0,05$ ), as amostras foram colhidas próximas à superfície (20 cm), MAALEJ et al. (2003) verificaram efeito da radiação solar na redução de *Aeromonas* spp.

O efeito de nutrientes, diluição da água e possível radiação não caracterizaram diferença ( $p \geq 0,05$ ) entre os locais para a porcentagem de isolamento de *Aeromonas* spp. nas amostras de água dos tanques-rede e da superfície dos peixes, enquanto para *Streptococcus* spp. a ocorrência foi maior ( $p \leq 0,05$ ), na superfície dos peixes no período seco.

Houve menor ocorrência de *Streptococcus* spp. nas amostras em relação à *Aeromonas* spp., isso pode ter ocorrido devido às temperaturas médias no período seco, de 25,1°C e no período chuvoso, de 27,9°C, terem sido mais favoráveis à multiplicação de *Aeromonas* spp., temperatura ótima de 22 a 28°C em relação aos *Streptococcus* spp., que exigem temperaturas mais altas 25 a 45°C (HOLT et al., 1994) e a diluição das águas no período chuvoso reduziu ainda mais sua presença nas amostras.

O efeito da diluição maior para amostras com menor multiplicação bacteriana, também caracterizou a diferença ( $p \leq 0,05$ ) para a porcentagem de isolamento de *Streptococcus* spp. e população de *Aeromonas* spp. maior na superfície dos peixes em relação às águas no período seco. Isso se deve ao fato dos peixes apresentarem na sua superfície reentrâncias nas escamas, brânquias e nadadeiras, que servem de suporte para maior aderência de matéria orgânica com conseqüente multiplicação bacteriana, sendo maior no ambiente represado dos tanques-rede e no período seco em função de menor fluxo de água. Esse resultado está de acordo com o encontrado por AL-HARB & UDDIN (2005), em que a porcentagem de isolamento de *Streptococcus* sp. foi maior nas brânquias de peixe do que na água e SOUSA & SILVA-SOUZA (2001),

onde houve maior abundância de *Aeromonas* nos peixes em relação à água do rio Congonhas, Paraná e por LIMA et al. (2006), em que a contagem total de bactérias em ordem decrescente foi: água de abastecimento < água dos tanques < muco dos peixes. Em função disso, sugeriram que o ambiente de criação favoreceu o aumento das populações de bactérias, e segundo OGAWA & MAIA (1999), a pele e brânquias de peixes, por estarem em contato com a água, apresentam um razoável nível de contaminação.

Nos tanques-rede, o represamento em função do número de peixes e da colmatação das malhas por deposição de resíduos orgânicos, como restos de ração, excretas, crescimento de algas e outros organismos reduziu o efeito da diluição causada pela cheia, nivelando a porcentagem de isolamento de *Aeromonas* spp. entre a água dos tanques-rede e da superfície dos peixes, não sendo verificada diferença ( $p \geq 0,05$ ). A microbiota do peixe é influenciada pela microbiota da água (AL-HARBI & UDDIN, 2005). MONFORT & BALEUX (1991) consideram que a distribuição de *Aeromonas* spp. e coliformes fecais estão sujeitos a efeitos de diluição, mas também a outros parâmetros ambientais.

A diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) para o P-total com concentração menor no período chuvoso, e maior na água dos tanques-rede, teve o mesmo comportamento para a ocorrência de *Aeromonas* spp. e de *Streptococcus* spp., enquanto a concentração do N-amoniaco aumentou no período chuvoso. Portanto, o P-total e a diluição das águas tiveram maior influência na ocorrência dessas bactérias no sistema aquático que o N-amoniaco e, as diferenças ( $p \leq 0,05$ ) de temperatura, mínima de 24,8°C e máxima de 27,9°C parece não ter influenciado a multiplicação dessas bactérias entre os dois períodos.

O efeito do represamento na água dos tanques-rede também propiciou o aumento da população de *Aeromonas* na superfície dos peixes no período seco, para a mesma porcentagem de isolamento em relação à água dos tanques-rede.

O maior suporte de matéria orgânica na água dos tanques-rede não caracterizou aumento na população de *Aeromonas* spp. em relação à água da lagoa e entre os

períodos ( $P \geq 0,05$ ). Devido ao maior represamento da água dos tanques-rede, houve maior ocorrência e contagens mais homogêneas, enquanto na água da lagoa houve menor ocorrência e grandes variações com altas reduções nas contagens devido ao efeito da diluição em relação aos pontos de amostragens mais equidistantes dos tanques-rede.

Não houve diferença ( $p \geq 0,05$ ) entre a água dos tanques-rede e a superfície dos peixes para o isolamento de *Aeromonas* nos dois períodos e para *Streptococcus* no período chuvoso. Os peixes para análise e a água foram recolhidos dos tanques-rede, portanto a contaminação nas amostras foram uniformes, estando de acordo com EL-SHAFI et al. (2004); AL-HARBI & UDDIN (2005), que consideram que a composição microbiológica da água de cultivo reflete na variedade de bactérias presente na pele dos peixes.

A diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) menor para a porcentagem de isolamento de *Aeromonas* spp. no rim dos peixes em relação aos outros locais é devido à proteção da pele pelos mecanismos de defesa naturais dos peixes. Anfíbios e peixes aparentemente saudáveis apresentam na pele peptídeos antimicrobianos (AMPs), que atuam como mecanismo de defesa contra patógenos bacterianos e fungos (CHO et al., 2009). Porém, no período chuvoso a diferença observada ( $p \leq 0,05$ ) maior para o isolamento de *Aeromonas* spp. nas amostras de rim dos peixes de 17% pode ser devido a depleção da concentração de OD a  $3,8 \text{ mg L}^{-1}$  ocorrida no período, na água dos tanques-rede o que pode ter causado estresse nos peixes, o que segundo FRANCIS-FLOYD (2003); KUBITZA (2003), excessivo estresse e risco de mortalidade em piscicultura ocorrem quando a concentração de oxigênio cai para concentrações inferiores a  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ .

REITH et al. (2008) relataram que a maioria das espécies de *Aeromonas* são agentes patogênicos oportunistas, introduzidos através de feridas ou afetam apenas animais imunocomprometidos, tendo como principal causa o estresse. Para EL-SHAFI et al. (2004); AL-HARBI & UDDIN (2005) a microbiota bacteriana comensal incluindo agentes patogênicos facultativos, a partir de certo limiar, que representa o limite dos mecanismos de defesa natural do peixe, é capaz de invadir os tecidos podendo originar

doenças nos peixes. Segundo KOZINSKA (2007), existe um risco permanente de surtos de doenças em piscicultura devido à ocorrência de *Aeromonas* patogênicas em órgãos internos de peixes saudáveis.

SALVADOR et al. (2003) encontraram variações para o OD em água de tanques-rede entre 4,0 e 7,6 mg L<sup>-1</sup> e a maior frequência de isolamentos *Streptococcus* spp. em tilápia do nilo foi observada nos períodos de menor concentração de OD.

EVANS et al. (2004) verificaram que tilápia do nilo infectadas com  $9,5 \times 10^1$  ou  $7,5 \times 10^2$  UFC de *S. agalactiae* e expostas a taxas subletais de OD de até 1 mg L<sup>-1</sup> por 24 h a taxa de mortalidade foi de 27% e 80% e para peixes expostos a nível aceitável não ocorreu mortalidade. Aumento da susceptibilidade de Tilápia do nilo para *S. agalactiae* pode ser o resultado da resposta de estresse para a exposição a taxas subletais de OD.

Não houve isolamento de *Streptococcus* spp. no cérebro dos peixes. Relatos de isolamento de *Streptococcus* spp. em cérebro são geralmente de peixes com sinais de infecção estreptocócica (SALVADOR et al., 2003 e 2005; PULIDO et al., 2004; FIGUEIREDO et al., 2006), entre outros. AMAL et al. (2008) observaram que a taxa de isolamento aumentou com a taxa de mortalidade, pois *Streptococcus agalactiae* foi isolado em cérebro, rins e olhos de tilápias sadias numa taxa menor que 5%, em ambiente sem relato de surto de doenças, onde a taxa de mortalidade foi de 5 e 45%, a porcentagem de isolamento foi de 8 a 55% e, com mortalidade de 5 a 60% houve aumento do isolamento de 5 a 78%. No presente estudo, a ausência de *Streptococcus* no cérebro dos peixes era esperada, apesar da mortalidade de 15% ocorrida no período chuvoso, os peixes não apresentavam sinais de estreptococose.

No período seco, a variação da temperatura da água de 24,8 a 25,1°C e concentração de OD 6,5 a 7,0 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 3), taxas de isolamento para *Streptococcus* spp. de 57% e para *Aeromonas* spp. de 83%, com população média de  $6,82 \times 10^2$  UFC mL<sup>-1</sup> nas amostras da superfície e isolamento em 10% das amostras de rim dos peixes (Tabela 4) não representaram problemas na criação de tilápias do nilo.

No período chuvoso, a variação da temperatura da água de 27,6 a 27,9°C e concentração de OD de 3,8 a 4,6 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 3) e taxas de isolamento para *Streptococcus* spp. de 32% e para *Aeromonas* spp. de 78% com população média de 3,14x10<sup>2</sup> UFC mL<sup>-1</sup> nas amostras da superfície e isolamento em 17% das amostras de rim dos peixes (Tabela 4) representaram perdas de 15% dos peixes, acima do considerado normal pelos produtores de tilápias do local de estudo. Nas criações de salmão do Norte da Europa, Canadá e Chile, uma taxa de mortalidade superior a 5% é um sinal de um surto de doença (TAN et al., 2006).

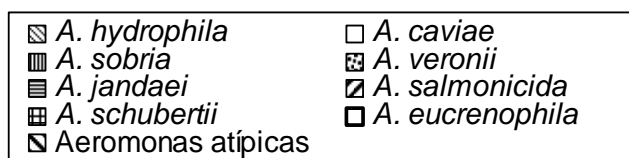
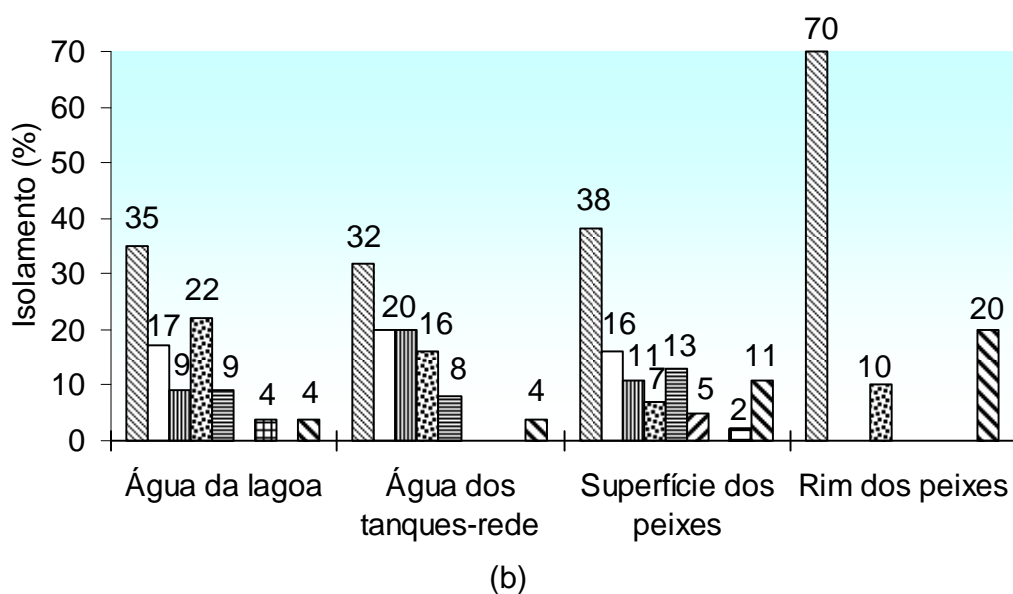
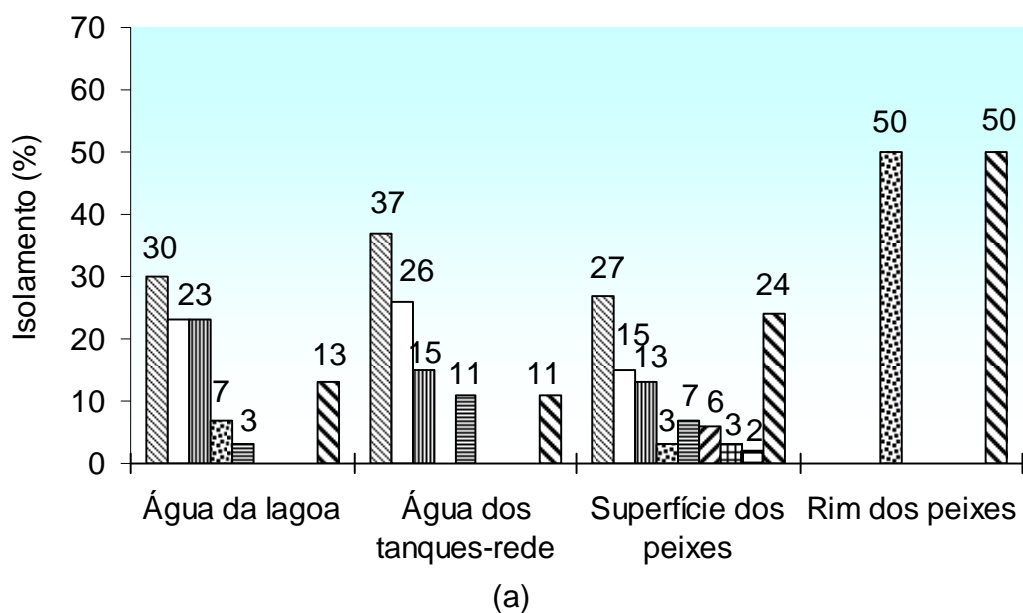
As diferenças encontradas para dados quantitativos como população e isolamento de microrganismos, quando comparadas com resultados de outros autores, são devido às características peculiares dos ambientes onde foram colhidas as amostras, principalmente quanto aos aspectos climáticos, bem como diferenças sutis atribuídas à natureza do ambiente onde os peixes foram capturados (AL-HARBI & UDDIN, 2005). Ao considerar o tipo de água, águas superficiais apresentam maior variabilidade nas características físicas, químicas e microbiológicas que as subterrâneas e, são mais afetadas pelas atividades humanas, inclusive podem ser contaminadas por excretas de animais domésticos e selvagens (MARTINS, 2005).

### 5.3. Distribuição das espécies de *Aeromonas*, *Streptococcus* e de gêneros relacionados

#### 5.3.1. Distribuição das espécies de *Aeromonas*

A distribuição das espécies de *Aeromonas* spp., identificadas nas amostras de água da lagoa, água dos tanques-rede, superfície e rim dos peixes nos dois períodos, seco (abril a setembro/08) e chuvoso (outubro/08 a março/09), encontra-se na Figura 4.

O total de *Aeromonas* spp. isoladas foram caracterizadas em oito espécies, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. jandae*, *A. salmonicida*, *A. eucrenophila*, *A. schubertii* e isolados considerados como atípicas.



**Figura 4.** Distribuição das espécies de *Aeromonas* isoladas das amostras de água da lagoa, água dos tanques-rede, superfície e rim dos peixes, nos períodos, seco (a) e chuvoso (b)

*Aeromonas hydrophila* foi a espécie dominante, isolada nas amostras de água da lagoa em 30 e 35%, na água dos tanques-rede em 37 e 32% e na superfície dos peixes em 27 e 38% nos períodos, seco e chuvoso, respectivamente.

O local de criação dos peixes não recebe esgotos domésticos e segundo ARAUJO et al. (1989), *Aeromonas hydrophila* é a espécie que apresenta a melhor sobrevivência/replicação em ambiente com baixa poluição. A pequena variação no isolamento dessa espécie entre as amostras de água e superfície dos peixes e entre os dois períodos pode estar relacionada a sua multiplicação, maior em água com temperatura mais elevada, de 27,9°C no período chuvoso ( $P \leq 0,05$ ), porém a cheia no período pode ter causado sua diluição em relação a outras espécies. Segundo SCHUBERT & MATZINOU (1990), *Aeromonas hydrophila* por ser adaptada à temperatura baixa, quando exposta a temperaturas mais elevadas multiplicam-se mais rápido.

O efeito da temperatura justifica os resultados, acima do encontrado por SCHAFFER et al. (2004) de 3,0% em amostras de rim e fígado de trutas aparentemente saudáveis criadas em água com temperatura média de 15°C.

A variação de isolamento de *A. hydrophila* nas amostras de água nos dois períodos de 30 a 37% se aproximaram dos encontrados por ARAUJO et al. (1991), em 32% das amostras de água de lagoa eutrofizada. As concentrações de P-total nas águas de 0,0223 a 0,0881 mg L<sup>-1</sup>, também pode ter favorecido sua multiplicação (ARAUJO et al., 1989; RIPPEY et al., 1994).

*Aeromonas caviae* foi a segunda espécie isolada (23 e 17%) na água da lagoa, (26 e 20%) na água dos tanques-rede e (15 e 16%) na superfície dos peixes, nos períodos seco e chuvoso, respectivamente. A menor frequência de isolamento dessa espécie em relação a *A. hydrophila* pode ser devido ao local de estudo não receber efluente de esgotos. A ocorrência de *A. caviae* associada a águas com maior nível de poluição fecal foi descrita por MONFORT & BALEUX (1990; 1991).

*Aeromonas sobria* foi isolada na água da lagoa em 23 e 9%, na água dos tanques-rede em 15 e 20% e na superfície dos peixes em 13 e 11% das amostras, nos

períodos seco e chuvoso, respectivamente. ARAÚJO et al. (1991) verificaram em isolados de 10 estações de tratamento de água no norte da Espanha que essa espécie predomina em águas menos poluídas ou com nenhuma poluição fecal.

*Aeromonas veronii* foi isolada em 7 e 22% das amostras de água da lagoa, em 0 e 16% da água dos tanques-rede, em 3 e 7% da superfície dos peixes e em 50 e 10% das amostras analisadas do rim dos peixes, nos períodos seco e chuvoso, respectivamente. Essa foi a espécie mais isolada na Espanha, em 43,6% das amostras de água doce (SOLER et al., 2002) e em tilápias criadas em Pesque-Pagues da Região Metropolitana de São Paulo (AZEVEDO et al., 2003). A predominância dessa espécie em 50% das amostras de rim no período seco deste trabalho também foi encontrada por KOZINSKA (2007), em 57% de amostras de rim de carpas sadias na Polônia e por AZEVEDO et al. (2003), em 31,9% de tilápias criadas em Pesque-Pagues da Região Metropolitana de São Paulo. RAHMAN et al. (2002) isolaram *Aeromonas veronii* biovar *sobria* de várias espécies de peixes com Síndrome Ulcerativa Epizoótica (SUE) em Bangladesh. OROZOVA et al. (2009) consideram essa espécie patogênica para peixes de águas tropicais e KOZINSKA (2007), para peixes de águas temperadas.

*Aeromonas jandaei* foi isolada nas amostras de água da lagoa em 3 e 9%, na água dos tanques-rede em 11 e 8% e na superfície dos peixes em 7 e 13%, nos períodos seco e chuvoso, respectivamente. Essa espécie também foi isolada por HIRSCH et al. (2006), em superfície corpórea de tilápias do nilo e água de tanques-rede de pisciculturas da região do Alto Rio Grande, Minas Gerais.

*Aeromonas salmonicida* e *A. eucrenophila* só foram isoladas nas amostras de superfície dos peixes em 6 e 5% e 2% e 2% das amostras, nos períodos seco e chuvoso, respectivamente. AUSTIN et al. (1998) consideram *A. salmonicida* de difícil isolamento em águas por sobreviver em ambiente aquático como cocultura com outras bactérias, e essa estreita associação diminui as chances de reconhecê-la em uma população mista.



*Aeromonas schubertii* só foi isolada nas amostras de superfície dos peixes em 3% no período seco e nas amostras de água da lagoa em 4% no período chuvoso, essa espécie apresenta potencial patogênico para seres humanos (CARNAHAN et al., 1989).

Embora tenham sido analisadas tilápias aparentemente saudáveis, foram encontradas as espécies potencialmente patogênicas para peixes de águas tropicais, *Aeromonas hydrophila*, (KOZINSKA, 2007) *A. caviae* (MARTINS et al., 2008), *A. sobria* (RAHMAN et al., 2002), *A. veronii* (OROZOVA et al., 2009) e *A. jandaei* (SANTOS et al., 1999) e também a espécie patogênica para peixes de águas frias *A. salmonicida* (AUSTIN et al., 1998). Com exceção de *A. salmonicida*, as demais espécies também foram isoladas na água da lagoa e dos tanques sem grandes diferenças, reforçando a hipótese de que a microbiota apresentada pelo pescado reflete a qualidade microbiológica do ambiente em que ele é capturado (MARTINS, 2005). O fato de essas espécies serem patogênicas para seres humanos pode implicar em gastroenterite pela ingestão de alimentos que venham a sofrer contaminação cruzada com esses peixes ou com a água, ou ainda infecção de ferida em pescadores e manipuladores portadores de dilacerações ou abrasões na pele, bem como para os que fazem uso da lagoa para recreação, pois acidentalmente pode ocorrer contato e ou ingestão dessa água (FIGUERAS et al., 2005; HIRANSUTHIKUL et al., 2005).

A divergência nos resultados do presente estudo com os dos autores pode ser devido às diferenças entre os ambientes em que foram coletadas as amostras. *Aeromonas* são encontradas com frequência em altos números em águas residuárias, porém as espécies são diferentes daquelas presentes em água limpa (RIPPEY & CABELLI, 1985). O local de criação dos peixes não recebe esgotos domésticos e as margens são protegidas por vegetação, o que reduz a lixiviação de água das encostas; portanto, esse ambiente apresenta características próprias, o que dificulta a comparação com dados de outros autores.

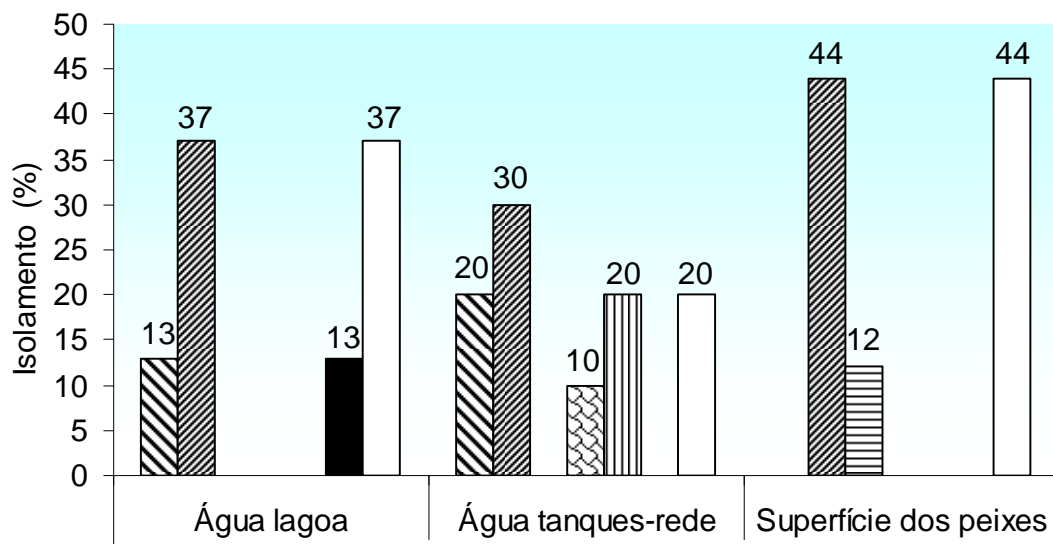
### 5.3.2. Distribuição das espécies de *Streptococcus* e de gêneros relacionados

A distribuição das espécies de *Streptococcus* spp. e de gêneros relacionados, identificados nas amostras de água da lagoa, água dos tanques-rede e superfície dos peixes nos dois períodos, seco (abril a setembro/08) e chuvoso (outubro/08 a março/09), encontra-se na Figura 5.

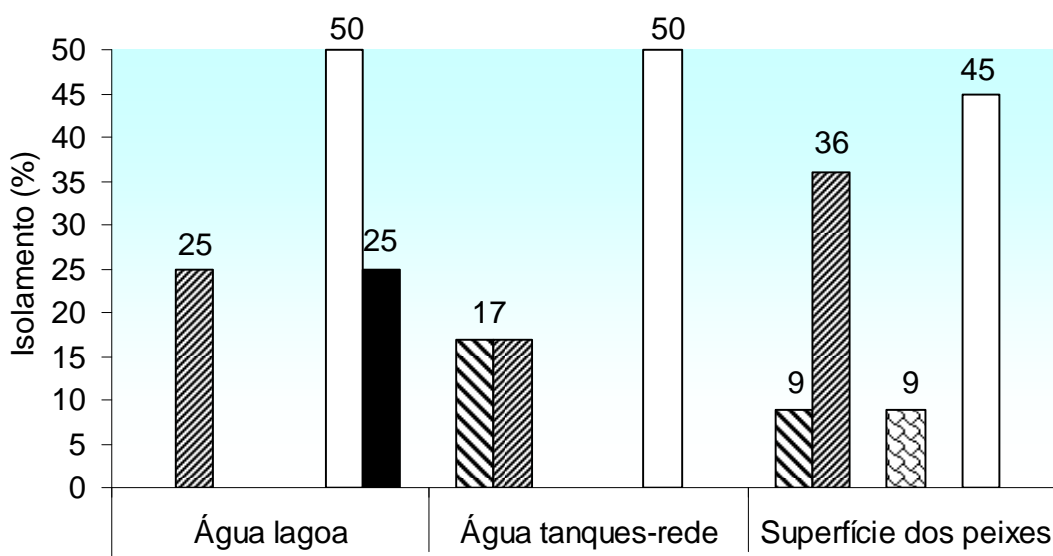
Os 55 isolados de *Streptococcus* spp. (cocos Gram-positivos, catalase negativos e incapacidade de crescimento em 6,5% de NaCl), do presente estudo, obtidos a partir das amostras de água da lagoa, água dos tanques-rede e superfície dos peixes, foram identificados como *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Streptococcus agalactiae*, *Aerococcus viridans*, *Streptococcus equinus*, *Streptococcus porcinus* e *Streptococcus mitis* e não identificado.

No período seco, houve maior diversidade de espécies na água da lagoa e água dos tanques-rede (Figura 5 a).

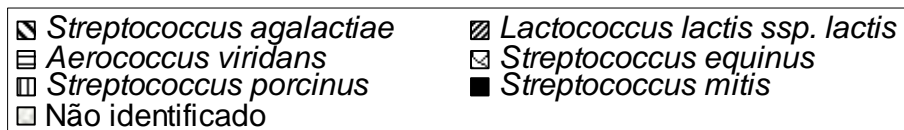
Das espécies identificadas, houve predominância de *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, com maior ocorrência nas amostras da superfície dos peixes em 44 e 36%, seguida da água da lagoa em 37 e 25% e água dos tanques-rede em 30 e 17% nos períodos seco e chuvoso, respectivamente. A maior porcentagem de isolamento foi no período seco (Figura 5 a). Essa espécie é reconhecida com significado clínico para humano e veterinário (VIANNI & LÁZARO, 2003; TEIXEIRA et al., 2009). Em humanos, *L. lactis* subsp. *lactis* têm sido associado com endocardite (TEIXEIRA et al., 2009). Confusão de identificação bioquímica dessa espécie tem sido relatada. Segundo COLORNI et al. (2003), o perfil bioquímico de isolado de lesões de peixe selvagem (*Coris aygula*) no Golf de Eilat (Israel), pelo sistema API 20 Strep e API 50-CH foi identificado como *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* e pelo sistema Rapid ID 32 Strep houve correspondência com *Lactococcus garvieae* (99,6% confiança), confirmado por PCR. *Lactococcus garvieae* não está incluído no sistema de identificação API.



(a)



(b)



**Figura 5.** Distribuição das espécies de *Streptococcus* e gêneros relacionados isolados da água da lagoa, água dos tanques-rede e superfície dos peixes, nos períodos seco (a) e chuvoso (b)

*Aerococcus viridans* foi isolado em 12% das amostras da superfície dos peixes e *Streptococcus mitis* nas amostras de água da lagoa em 13 e 25% nos períodos seco e chuvoso, respectivamente. Essas espécies são relatadas em infecções dentárias e endocardites em seres humanos (SMITH & JACKSON, 2003).

*Streptococcus porcinus* foi isolado em 20% das amostras de água dos tanques-rede no período seco. *Streptococcus equinus* foi isolado em 10% das amostras de água dos tanques-rede no período seco e em 9% das amostras de superfície dos peixes no período chuvoso. *Streptococcus porcinus* foi isolado do trato geniturinário de humanos (DUARTE et al. 2005). Apesar de essa espécie apresentar algum potencial zoonótico (FACKLAM et al., 2005), a patogenicidade provavelmente depende da combinação bacteriana, hospedeiro e parâmetros ambientais (COLORNI et al., 2003).

A espécie *Streptococcus agalactiae*, no período seco, só foi isolada nas amostras de água, e no período chuvoso, apesar dessa espécie ter sido isolada na superfície dos peixes, a ocorrência de 9% foi menor que o encontrado nas amostras de água nos dois períodos. JAFAR et al. (2009) também encontraram no Kuwait, maior ocorrência de *S. agalactiae* em águas residuárias que nos tecidos de peixes doentes coletados dessas águas.

Os isolados de *Streptococcus* spp., que não foram identificadas pelo sistema API 20 Strep, representaram 44 e 45% das amostras de superfície dos peixes, 20 e 50% da água dos tanques-rede e 37 e 50% da água da lagoa, nos períodos seco e chuvoso, respectivamente.

SALVADOR et al. (2005) verificaram que de 36 amostras de estreptococos provenientes de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*), 16 amostras foram identificadas como *Streptococcus agalactiae* e 20 não foram caracterizadas pelo API 20 Strep, mas apresentaram o mesmo perfil bioquímico descrito para a cepa de referência de *Streptococcus difficile* (ND-2-22). Para DUARTE et al. (2005), isolados de *S. porcinus* apresentam características bioquímicas similares e sorologicamente reações cruzadas com *Streptococcus agalactiae* (Lancefield grupo B) e para FACKLAM et al. (1995), *S. porcinus* também apresentam positivo no teste CAMP.

Em temperatura da água acima de 16°C nos meses de verão em climas temperados, a espécie *Lactococcus garvieae* causa problema na aquicultura (VENDRELL et al., 2006). Para TAN et al. (2006), ao contrário de *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus agalactiae* pode ser encontrado em Tilápia, em climas tropicais, durante o verão, quando a temperatura da água excede a 30°C. Quando a temperatura da água está abaixo de 30°C, a mortalidade associada a este agente patogênico é baixa.

A temperatura média da água neste estudo variou do mínimo de 24,8°C no período seco a máxima de 27,9°C no período chuvoso, sem diferença significativa entre os locais (Tabela 3). Essas temperaturas justificam a maior porcentagem de isolamento para *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* no período seco.

A baixa porcentagem de isolamento de *Streptococcus agalactiae* deste estudo está relacionada à temperatura desfavorável, à sua multiplicação e à diluição da água ocorrida no período chuvoso, como discutido para o menor isolamento do gênero.

*Streptococcus agalactiae* não foi identificado na superfície dos juvenis analisados antes do povoamento. Como essa bactéria foi identificada na água, ela pode estar presente naturalmente ou, a água ter sido contaminada por algum povoamento anterior, com lotes de alevinos/juvenis portadores dessa bactéria. FIGUEIREDO et al. (2006) consideram que a ocorrência de infecção por *S. agalactiae* numa piscicultura de produção de alevinos pode representar a disseminação do agente para várias regiões do país, uma vez que os alevinos são vendidos para engorda em diferentes regiões geográficas e podem ser portadores assintomáticos dessa bactéria. E para YANONG & FRANCYS-FLOYD (2006), bactérias endêmicas em uma população de peixes se tornam mais prejudiciais para os novos peixes introduzidos na massa de água, podendo ocorrer grandes perdas desses peixes recém-estocados.

Das estirpes de *Streptococcus* spp. deste estudo, identificadas como *Lactococcus lactis* spp. *lactis* e as que não foram identificadas pelo sistema API 20 Strep, podem estar incluídas várias espécies de *Streptococcus* de significado zoonótico; porém, apenas um estudo genético poderia responder a esta pergunta.

Portanto, a presença desses isolados nas águas e nos peixes não deve ser negligenciada, bem como, dos isolados identificados como *Streptococcus agalactiae*. Essa espécie presente na água em algum momento pode causar doenças, principalmente para novos lotes de alevinos/juvenis usados no povoamento dos tanques-rede (YANONG & FRANCYS-FLOYD, 2006), e também quando ocorrer elevação da temperatura da água (TAN et al., 2006; AMAL et al., 2008). E, como discutido para *Aeromonas hydrophila* e *A. veronii*, a espécie *S. agalactiae* também pode causar, quando em contato com seres humanos sensíveis, sérias infecções caracterizadas por bacteremia, endocardites, osteomielite e infecções de tecido (KAWAMURA et al., 2003).

#### 5.4. Atividade hemolítica

##### 5.4.1. Atividade hemolítica dos isolados de *Aeromonas*

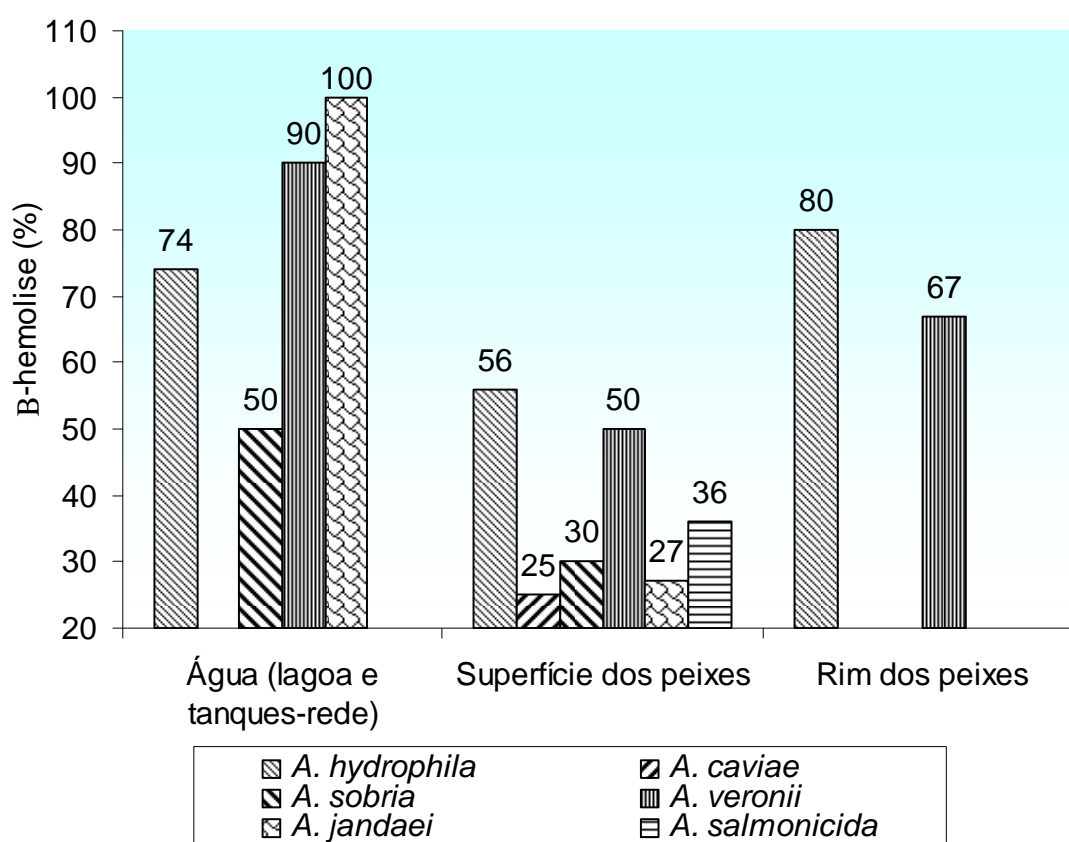
Atividade hemolítica foi detectada em 65 (57%) das 114 culturas estudadas, sendo 35 isolados das amostras de água, 24 da superfície e 6 dos rins dos peixes. O resultado da atividade hemolítica das culturas encontra-se na Figura 6.

*A. jandaei* foi a espécie em que a atividade hemolítica foi maior em isolados das amostras de água (100%), seguida por *A. veronii* (90%), *A. hydrophila* (74%) e *A. sobria* (50%). Para isolados da superfície e rim dos peixes, *A. hydrophila* foi a espécie mais hemolítica (56 e 80%), seguida de *A. veronii* (50 e 67%), respectivamente. *A. salmonicida*, *A. sobria*, *A. jandaei* e *A. caviae* isoladas da superfície dos peixes também apresentaram atividade hemolítica. Essas espécies podem ser consideradas potencialmente patogênicas (BRANDI et al., 1999; DI BARI et al., 2007).

A produção de hemólise para uma mesma espécie foi maior para os isolados da água, seguida do rim e superfície dos peixes, exceto para os isolados de *A. hydrophila* do rim dos peixes em que a atividade hemolítica foi maior.

NAKANO et al. (1990), verificaram em isolados de águas superficiais de ambientes fluvial e marítimo que *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas sobria* foram

altamente hemolíticas e MONFORT & BALEUX (1990) encontraram produção de hemolisina para 100% das estirpes de *Aeromonas hydrophila* e *A. sobria* isoladas da água de lagoa salobra de tratamento de esgotos, sul da França e MONFORT & BALEUX (1991), em outro estudo, para isolados do mesmo local, encontraram 96% de *A. hydrophila* e 97% de *A. sobria* produtoras de hemolisina. Esses resultados estão acima dos encontrados no presente trabalho, para isolados de amostras de água, que foi de 74% para *A. hydrophila* e de 50% para *A. sobria*.



**Figura 6.** Atividade hemolítica dos isolados de *Aeromonas* da água (lagoa e tanques-rede), superfície e rim dos peixes

Dos isolados de *A. caviae* da superfície dos peixes, 25% apresentaram atividade hemolítica. Esse resultado está acima do encontrado por NAKANO et al. (1990), em

isolados de águas superficiais de ambientes fluvial e marítimo, em que apenas 11% dos isolados de *A. caviae* foram capazes de causar lise em eritrócitos de ovinos.

ABBOTT et al. (2003) encontraram em isolados de amostras clínicas, de animais e ambientais, 100% de hemólise para estirpes de *A. veronii*. Esses resultados estão acima dos encontrados no presente trabalho, para isolados de *A. veronii* de amostras de água que foi de 90%, da superfície foi de 50% e do rim dos peixes foi de 67%. RAHMAN et al. (2002) verificaram que isolados de *A. veronii* biovar sobria de peixe com Síndrome Ulcerativa Epizoótica (SUE) em Bengladesh apresentaram atividade hemolítica e aglutinaram eritrócitos de peixes podendo ser um agente causal da SUE nos peixes.

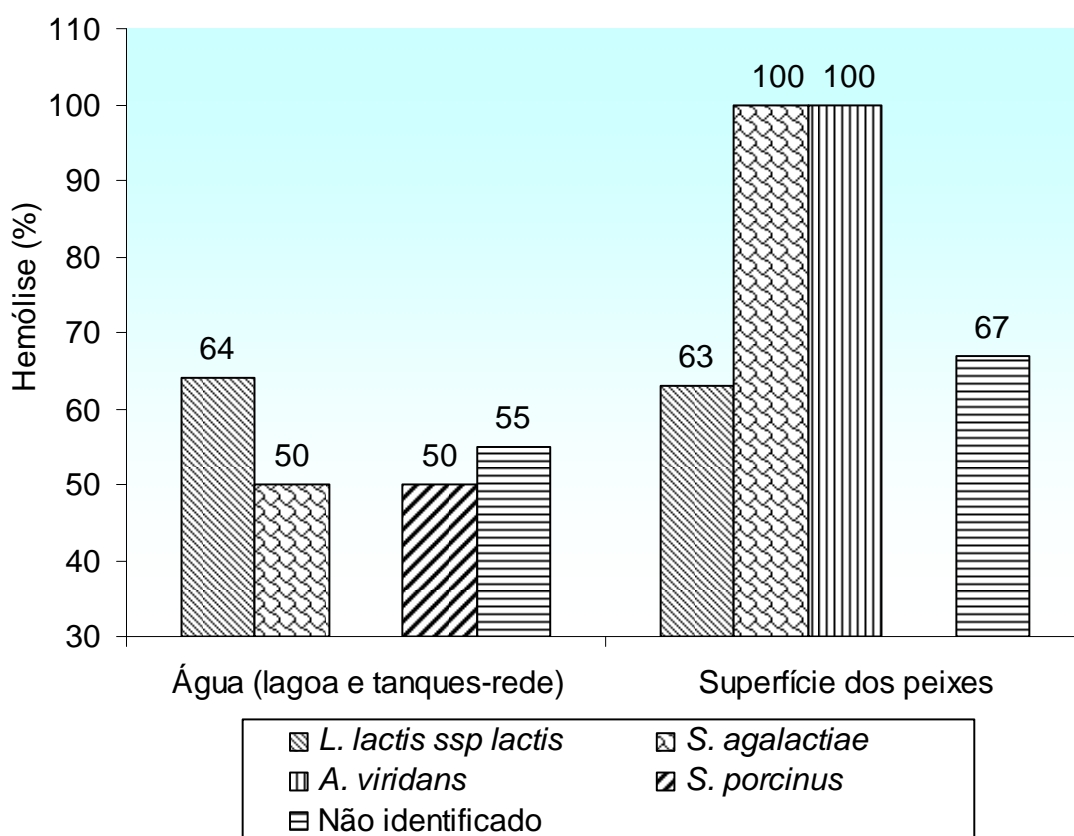
As diferenças para a atividade hemolítica de aeromonas encontradas neste estudo pode ter sido influenciada pelas condições ambientais de multiplicação, o que altera a expressão de genes que codificam hemolisina (WANG et al., 2003). Aeromonas cultivadas em temperatura mais baixa apresentam mais estirpes e fatores de virulência reunidos que aeromonas cultivadas em temperatura mais alta (GONZÁLEZ-SERRANO et al., 2002). Segundo CHACÓN et al. (2003), em isolados clínicos a atividade  $\beta$ -hemolítica é significativamente mais frequente que em isolados ambientais. Para ABBOTT et al. (2003), o aumento da incidência em isolados clínicos é devido à transferência horizontal de genes de hemolisina de espécies de *Aeromonas* hemolítica, para espécies não hemolíticas.

*Aeromonas hydrophila* foi a espécie predominante nos peixes e nas águas nos dois períodos, e no rim dos peixes no período chuvoso e *A. veronii* foi isolada no rim dos peixes (Figura 4). Esses dados, aliados à maior produção de hemólise por essas espécies, permitem inferir que elas podem ter contribuído para a mortalidade de tilápias ocorrida nos tanques-rede no período chuvoso. O fato da atividade hemolítica dos isolados da água ser maior que os da superfície dos peixes (Figura 6) pode constituir problema de saúde pública. Há vários relatos que demonstram gastroenterite e infecções de ferida causadas *Aeromonas* spp. veiculadas por peixes e águas contaminadas (FIGUERAS et al., 2005; VALLY et al., 2004; HIRANSUTHIKUL et al., 2005).



#### 5.4.2. Atividade hemolítica dos isolados de *Streptococcus* e gêneros relacionados

Atividade hemolítica foi detectada em 46 (59%) das 78 culturas estudadas, sendo 20 isolados das amostras de água e 26 da superfície dos peixes. O resultado da atividade hemolítica das culturas encontra-se na Figura 7.



**Figura 7.** Atividade hemolítica dos isolados de *Streptococcus* e gêneros relacionados da água (lagoa e tanques-rede) e superfície dos peixes

*A. viridans* e *S. agalactiae* foram as espécies em que a atividade hemolítica foi maior em isolados das amostras da superfície dos peixes (100%), seguida dos isolados não identificados (67%). Para isolados da água, *S. agalactiae* e *S. porcínus* apresentaram a mesma porcentagem de isolados hemolíticos (50%). *Lactococcus lactis ssp. lactis* isolados da água, apresentaram a mesma porcentagem de hemólise

que os isolados da superfície dos peixes (63%), seguida de isolados não identificados (55%). Esses isolados podem ser considerados potencialmente patogênicos (EVANS et al., 2002, NIZET, 2002; BORGER et al., 2005). Não foi observado nenhum tipo de hemólise para *S. equinus* e *S. mitis*.

*S. agalactiae* e isolados não identificados apresentaram maior porcentagem de isolados  $\beta$ -hemolíticos na superfície dos peixes, comparados aos isolados da água. A não produção de  $\beta$ -hemólise em 50% dos isolados das amostras de água não descaracteriza a patogenicidade desses isolados, pois essa espécie poder ser alfa, beta ou não produzir hemólise em ágar sangue (KAWAMURA et al., 2005). Segundo EVANS et al. (2002), hemólise é muitas vezes usada para diferenciar e identificar os estreptococos que são patogênicos para peixes. Esse ensaio não deve ser usado sozinho devido à variabilidade das metodologias empregadas, avaliação em diferentes momentos de incubação e interpretações de hemólise.

Diferentes características fenotípicas de *S. agalactiae* têm sido observadas entre isolados de pescado (EVANS et al., 2002; SALVADOR et al., 2005). SALVADOR et al. (2005) não verificaram hemólise em 16 amostras identificadas como *Streptococcus agalactiae* de 36 estirpes de estreptococos provenientes de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*). EVANS et al. (2008) compararam geneticamente estirpes de *Streptococcus agalactiae* de vários hospedeiros e regiões geográficas. Em 11 estirpes isoladas de peixes, 6 não produziram hemólise, inclusive a cepa ATCC 51487.

*Aerococcus viridans* é considerado  $\alpha$  hemolítico (HOLT et al., 1994). Em nosso trabalho, 100% dos isolados da superfície dos peixes foram  $\beta$ -hemolíticos. Essa espécie tem sido isolada de infecções dentárias e endocardites (FACKLAM, 2002; SMITH & JACKSON, 2003) e *S. porcinus* é  $\alpha$  e  $\beta$  hemolítico (HOLT et al., 1994; FACKLAM et al., 1995; MARTIN et al., 2004; DUARTE et al., 2005). *S. porcinus* podem ser patogênicos para seres humanos (FACKLAM et al., 1995; DUARTE et al., 2005). Porém, a atividade hemolítica, o CAMP teste e outras características bioquímicas de estirpes clínicas de *S. porcinus* levam à confusão com isolados de *S. agalactiae* (FACKLAM, 2002).

## 5.5. Resistência a antimicrobianos

### 5.5.1. Resistência a antimicrobianos pelas espécies de *Aeromonas*

O comportamento frente a antimicrobianos das espécies de *Aeromonas* isoladas na água, superfície e rim dos peixes, encontra-se na Tabela 5.

**Tabela 5** - Resistência a antimicrobianos por espécies de *Aeromonas* isoladas da água (lagoa e tanques-rede), superfície e rim dos peixes

Espécies	Origem	Resistência a antimicrobianos (%)							
		Gen	Nal	Tet	Ofx	Eri	Amo	Lvx	Clo
		10 µg	30 µg	30 µg	5 µg	15 µg	10 µg	5 µg	30 µg
	Padrão <sup>a</sup>	0	0	0	0	0	100	0	0
<i>A. hydrophila</i>	Água (n=10)	0	0	0	0	50	100	0	0
	Superfície (n=10)	0	0	0	0	50	100	0	0
	Rim (n=2)	0	0	0	0	0	100	0	0
<i>A. caviae</i>	Água (n=4)	0	0	0	0	50	100	0	0
	Superfície (n=4)	0	0	0	0	50	100	0	0
<i>A. sobria</i>	Água (n=4)	0	0	0	0	50	100	0	0
	Superfície (n=4)	0	0	0	0	50	100	0	0
<i>A. veronii</i>	Água (n=7)	0	0	43	0	43	100	0	0
	Superfície (n=6)	0	0	50	0	33	100	0	0
	Rim (n=2)	0	0	50	0	50	100	0	0
<i>A. salmonicida</i>	Superfície (n=7)	29	0	43	0	57	100	0	0
<i>A. jandaei</i>	Água (n=7)	0	0	0	0	43	100	0	0
	Superfície (n=7)	0	0	0	0	57	100	0	0
Total de isolados (n=74)		3	0	14	0	47	100	0	0

<sup>a</sup> = Cepa padrão cedida pela FIOCRUZ–RJ

n = Número de isolados testados

Gen = Gentamicina, Nal = Ácido nalidíxico, Tet = Tetraciclina, Ofx = Ofloxacina, Eri = Eritromicina, Amo = Amoxicilina, Lvx= Levofloxacina e Clo = Cloranfenicol

O total de 74 estirpes caracterizadas como pertencentes às espécies *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. salmonicida* e *A. jandaei* isoladas das amostras de água, superfície e rim dos peixes revelou resistência à amoxicilina e sensibilidade ao ácido nalidíxico, ofloxacina, levofloxacina e cloranfenicol. Dos isolados de *A. salmonicida* da superfície dos peixes, 29% apresentaram resistência à gentamicina e 43% à tetraciclina e para *A. veronii*, 43% dos isolados de amostras da água e 50% da superfície e rim dos peixes também apresentaram resistência à tetraciclina. A eritromicina foi o antibiótico que apresentou maior variação na resistência para as espécies de aeromonas e para as origens dos isolados.

Resistência à amoxicilina por todas as estirpes de todas as origens deste estudo estão de acordo com BIZANI & BRANDELLI (2001), que encontraram 100% de resistência a esses antibióticos por *A. hydrophila* e *A. sobria* isoladas em amostras de água de abastecimento e lavagem final de carcaça em abatedouro de bovinos, em Porto Alegre, e por HIRANSUTHIKUL et al. (2005), em isolados de *Aeromonas* de infecções de tecido mole de pacientes na Tailândia depois do Tsunami de 2004.

A sensibilidade de 100% dos isolados de *A. hydrophila* para a tetraciclina e gentamicina deste trabalho foram idênticos aos resultados de BARCELLOS et al. (2008), para estirpes de *A. hydrophila* isoladas de amostras de rins, baço, fígado, pele e músculo de jundiás (*Rhamdia quelen*). Entretanto, os resultados dos autores para sensibilidade ao cloranfenicol e sensibilidade intermediária à eritromicina estão abaixo dos encontrados neste estudo para isolados do rim dos peixes que foi de 100%.

ÁLVAREZ et al. (2006) observaram que *Aeromonas hydrophila* proveniente da água de cultivo de tilápias do Lago de Valencia apresentaram 100% resistência à gentamicina, tetraciclina e eritromicina. Enquanto, neste trabalho, essas estirpes foram sensíveis para gentamicina e tetraciclina e apresentaram resistência variável à eritromicina. Para sensibilidade ao ácido nalidíxico e cloranfenicol, os resultados foram compatíveis.

Os resultados deste estudo para sensibilidade à gentamicina e resistência à amoxicilina por *Aeromonas caviae* estão de acordo com os de AL-BENWAN et al.

(2007), para isolados dessa espécie de paciente com cistite no Kuwait em que foram sensíveis à ciprofloxacina, cefotaxina e gentamicina e resistentes à amoxicilina, cotrimoxazole, ampicilina, cefuroxime e cephalothin.

Segundo HIRSCH et al. (2006), os dados de resistência ao cloranfenicol são extremamente variáveis dentro do gênero, não havendo parâmetro a ser considerado, bem como para ofloxacina e levofloxacina. Neste trabalho, todas as estirpes de todas as origens foram sensíveis a esses antibióticos.

Foi confirmado para todas as espécies de *Aeromonas* testadas resistência apenas à amoxicilina.

Não foram verificadas grandes diferenças quanto à resistência para uma mesma espécie isolada da água comparada à superfície dos peixes.

A resistência variável à eritromicina, apresentada por todas as espécies de *Aeromonas* isoladas da água e superfície dos peixes neste estudo, também foi encontrada por HIRSCH et al. (2006), em isolados de superfície corpórea de peixes e de água do tanque de criação e atribuíram essa resistência à multiplicação de clones resistentes que pode ter sido proveniente dos alevinos ou da ração.

A resistência variável à tetraciclina apresentada pelos isolados de *A. veronii* e *A. salmonicida*, neste estudo, pode ser pela facilidade dessas espécies em desenvolver resistência na presença de baixas concentrações de antibióticos (GOÑI-URRIZA et al., 2000). Segundo ÁLVAREZ et al. (2004), na Venezuela, o ácido oxolínico, cloranfenicol, eritromicina e a tetraciclina, são amplamente usados na aquicultura para o controle de patógenos Gram negativos. O cloridrato de oxitetraciclina é um dos antibióticos de uso permitido nos Estados Unidos para controle de Septicemia por *Aeromonas Móveis* (MAS) causada *Aeromonas hydrophila* (FAO, 2009). No Brasil, a oxitetraciclina já é utilizada para controle e profilaxia de doenças bacterianas nos peixes (PEREIRA JR et al., 2006).

*Aeromonas salmonicida* não é considerada patogênica para espécies de peixes de regiões de clima tropical; porém, para as demais bactérias consideradas

patogênicas, a resistência variável à eritromicina e à tetraciclina já pode ser considerada motivo de alerta para a piscicultura em estudo.

#### 5.5.2. Resistência a antimicrobianos pelas espécies de *Streptococcus* e de gêneros relacionados

O comportamento frente aos antimicrobianos das espécies de *Streptococcus* isoladas na água e superfície dos peixes encontra-se na Tabela 6.

**Tabela 6.** Resistência a antibióticos por espécies de *Streptococcus* e de gêneros relacionados isolados da água (lagoa e tanques-rede) e superfície dos peixes

Espécies	Origem	Resistência a antimicrobianos (%)									
		Gen 10µg	Nal 30µg	Tet 30 µg	Amp 10 µg	Eri 15 µg	Amo 10 µg	Cotr 25 µg	Pen 10 µg	Nor 10 µg	Neo 30 µg
	Padrão <sup>a</sup>	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. agalactiae</i>	Água (n=4)	0	100	25	0	25	0	25	0	0	0
	Superfície (n=1)	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. lactis</i> ssp. lactis	Água (n=11)	9	100	64	0	27	0	64	0	45	45
	Superfície (n=16)	25	100	75	0	0	0	50	0	37	31
<i>A. viridans</i>	Superfície (n=2)	0	100	100	0	0	0	0	0	50	0
<i>S. equinus</i>	Água (n=1)	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
	Superfície (n=1)	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. porcinus</i>	Água (n=2)	50	100	100	0	0	0	100	0	50	0
<i>S. mitis</i>	Água (n=1)	0	100	0	0	0	0	100	0	100	100
Não identificado	Água (n=6)	0	100	67	0	0	0	67	0	0	0
	Superfície (n=5)	40	100	20	0	0	0	100	0	0	0
Total de isolados (n=50)		14	100	58	0	8	0	56	0	28	22

<sup>a</sup> = Cepa padrão cedida pela FIOCRUZ–RJ.

n=Número de isolados testados, Gen=Gentamicina, Nal=Ácido nalidíxico, Tet=Tetraciclina, Amp=Ampicilina, Eri=Eritromicina, Amo=Amoxicilina, Cotr=Cotrimoxazol, Pen=Penicilina, Nor=Norfloxacina e Neo=Neomicina.

Os 50 isolados de *Streptococcus* spp. foram resistentes ao ácido nalidíxico na concentração de 30 µg. Esse antibiótico também foi usado no meio de cultura na concentração de 15 µg para prevenir o crescimento de Gram negativos e *Staphylococcus* spp.

Sensibilidade à ampicilina, amoxicilina e à penicilina foi verificada para todas as estirpes de *Streptococcus* testadas. Esses antibióticos foram utilizados para validação do estudo; pois, segundo o NCCLS (2005), a ampicilina é representante da amoxicilina e um isolado de estreptococo sensível à penicilina pode ser considerado sensível à ampicilina e amoxicilina, não sendo necessário testá-lo para esses agentes.

A exceção do ácido nalidíxico, *Streptococcus agalactiae* isolado da superfície dos peixes e a cepa padrão foram sensíveis a todos os antibióticos testados, enquanto para os isolados da água, 25% apresentaram resistência a tetraciclina, eritromicina e cotrimoxazol. Para BORGER et al. (2005); GOMES (2008), a maioria das amostras de *S. agalactiae* apresentam resistência ou sensibilidade intermediária frente à tetraciclina.

Como já era previsto, para o NCCLS (2005), *Streptococcus agalactiae* ou *Streptococcus pyogenes* são sensíveis à penicilina e à ampicilina, podendo ser resistente à eritromicina; no entanto, GAUDREAU et al. (2010) verificaram um caso de *Streptococcus agalactiae* resistente à penicilina G e tetraciclina e sensível à eritromicina.

Os resultados para a cepa de *S. agalactiae*, isolada da superfície dos peixes neste estudo, estão de acordo com FIGUEIREDO et al. (2006), para a sensibilidade à eritromicina e à tetraciclina e por EVANS et al. (2002), para sensibilidade à ampicilina e amoxicilina, discordando da resistência para gentamicina verificada pelos autores.

Para *L. lactis* ssp. *lactis*, 55% das estirpes isoladas da água e 63% da superfície dos peixes apresentaram sensibilidade à norfloxacin e resistência à penicilina e ampicilina. Esses resultados estão acima dos encontrados por VIANNI & LÁZARO (2003), para estirpes de *Lactococcus garvieae* isolados de mastite bovina que revelaram 47,62% sensíveis à norfloxacin e resistência à penicilina e ampicilina. Para

a gentamicina, tetraciclina, cotrimoxazol, norfloxacin e neomicina a resistência foi variável.

*Aerococcus viridans* isolados da superfície dos peixes apresentaram sensibilidade para gentamicina, eritromicina, cotrimoxazol e neomicina e resistência à tetraciclina, enquanto 50% dos isolados foram resistentes à norfloxacin. A sensibilidade para ampicilina, amoxicilina e penicilina discordam dos apresentados por FACKLAM (2002), que considera *A. viridans* normalmente resistente para  $\beta$ -lactâmicos, no caso ampicilina, amoxicilina e penicilina, no entanto para estirpes isoladas de paciente com endocardite bacteriana, a resistência à penicilina foi de 48% em isolados nos EUA, 45% do Canadá e em 33% das isoladas na América Latina.

Para *S. equinus*, todos os isolados da água e da superfície dos peixes foram sensíveis à gentamicina, tetraciclina, eritromicina, cotrimoxazol, norfloxacin e neomicina.

*Streptococcus porcinus* isolados de amostras da água neste estudo foram sensíveis à eritromicina e 50% dos isolados foram sensíveis para gentamicina e norfloxacin e resistentes à tetraciclina e cotrimoxazol, apresentando o mesmo perfil das estirpes isoladas de humanos por FACKLAM et al. (1995); DUARTE et al. (2005), quanto a sensibilidade à ampicilina, eritromicina, amoxicilina, penicilina e neomicina e resistência à tetraciclina.

*S. mitis* isolados da água foram sensíveis à gentamicina, tetraciclina e eritromicina e resistentes à cotrimoxazol, norfloxacin e neomicina. A sensibilidade aos antibióticos testados foi maior neste estudo que os encontrados por BANCESCU et al. (2004) para isolados de infecção dental humana, para a tetraciclina e penicilina de 50% e para a ampicilina e eritromicina de 83% e aos encontrado por SMITH & JACKSON (2003), em que a resistência à penicilina foi de 9% e à eritromicina de 29%, em 35 isolados.

Todas as estirpes não identificadas pelo sistema API 20 Strep foram sensíveis à eritromicina, norfloxacin e neomicina e resistentes à tetraciclina para 67 e 20% e ao cotrimoxazol para 67 e 100% dos isolados da água e da superfície dos peixes,



respectivamente. Para a gentamicina, todos os isolados da água apresentaram sensibilidade, enquanto 40% dos isolados da superfície dos peixes foram resistentes.

A resistência apresentada à eritromicina e à tetraciclina por estirpes de *Streptococcus agalactiae*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* e *Streptococcus* não identificados isolados da água e da superfície dos peixes é preocupante; pois a tetraciclina é o antibiótico eleito em ambientes de criação de peixes.

## VI. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem destacar que houve alterações de parâmetros físico-químicos da água mais relacionados a variações ambientais do que com a atividade da criação intensiva de tilápias do nilo em tanques-rede; e que afetaram a distribuição de *Aeromonas* e *Streptococcus* na água e nos peixes no período de estudo. E as seguintes conclusões podem ser descritas:

✚ Dos parâmetros físico-químicos avaliados, o P-total no período seco e o OD no período chuvoso não atenderam às exigências para água doce de classe 2 da resolução do CONAMA de 2005;

✚ A atividade de criação intensiva de peixes foi responsável na água dos tanques-rede, pelo aumento da concentração do N-amoniaco no período seco, do P-total nos dois períodos e da depleção de OD no período chuvoso;

✚ No período seco, o aumento do P-total no ambiente e maior ocorrência de *Streptococcus* spp. em todos os locais analisados, não representaram problemas para os peixes;

✚ No período chuvoso, a depleção acentuada da concentração de OD, somada ao maior isolamento das espécies *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. jandaei* e *Streptococcus agalactiae* na superfície dos peixes e de *Aeromonas*

*hydrophila* e *A. veronii* no rim dos peixes pode ter sido a causa da mortalidade de 15% dos peixes nos tanques-rede;

✚ Elevado número de isolados produtores de  $\beta$ -hemólise de espécies de *Aeromonas* na água e rim dos peixes pode representar problema de saúde para os peixes e usuários da água como pescadores, manipuladores de peixes e para os que fazem uso da lagoa para recreação;

✚ *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sóbria* e *A. jandaei* isoladas da água e superfície dos peixes e *A. veronii* isoladas da água, superfície e rim dos peixes foram resistentes à amoxicilina e apresentaram resistência variável à eritromicina e *A. veronii* também à tetraciclina;

✚ *Streptococcus agalactiae* isolados da água apresentaram resistência variável à eritromicina, tetraciclina e cotrimoxazol.

## VII. REFERÊNCIAS

ABBOTT, S. L.; CHEUNG, W. K. W.; JANDA, J. M. The Genus *Aeromonas*: Biochemical characteristics, ctypical reactions, and phenotypic identification schemes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2348–2357, 2003.

ABBOTT, S. L., SERVE, H.; JANDA, J. M. Case of *Aeromonas veronii* (DNA group 10) bacteremia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n.12, p. 3091–3092, 1994.

ALBANEZ, J. R.; MATOS, A. T. **Aquicultura**. In: MACÊDO, J. A. B. de. Águas & Águas. Aquicultura. Belo Horizonte-MG: CRQ-MG, 2004.

AL-BENWAN, K.; ABBOTT, S.; JANDA, M.; HUYS, G.; M. JOHN ALBERT. Cystitis caused by *Aeromonas caviae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 7, p. 2348–2350, 2007.

AL-HARBI, A. H.; UDDIN, M. N. Bacterial diversity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in brackish water in Saudi Arabia. **Aquaculture**, v. 250, n. 3-4, p. 566– 572, 2005.

ÁLVAREZ, R. J. D.; AGURTO, C. P.; ÁLVAREZ, A. M. Y OBREGÓN, J. Resistência antimicrobiana en bacterias aisladas de tilapias, agua y sedimento em Venezuela. Laboratorio de Microbiología de Peces y Crustáceos, **INIA - CENIAP**. Maracay, estado Aragua, Venezuela, v. XIV, n. 6, 2004.

ALVES, R. C. P. **Monitoramento de características físico-químicas da água e taxas de sedimentação de Trypton no córrego da arribada (baixo Tietê-SP) relacionadas à piscicultura em tanques-rede**. Jaboticabal: CAUNESP, 2006, 53 p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

AMAL, M. N. A.; ZAMRI-SAAD, M.; SITI-ZAHRAH, A.; SABRI, M. Y. Streptococcus agalactiae isolation patterns from cage cultured tilapia. In: 8<sup>th</sup> International Symposium on Tilapia in Aquaculture, 2008, Malaysia. **Anais...** Malaysia: Penang, 2008. p. 1253-1258.

ANDERSEN, J. M. An ignition method for determination of total phosphorus in lake sediments. **Water Research**, v.10, p. 329 – 331, 1976.

ARAUJO, R. M., ARRIBAS, R. M., PARES, R. Distribution of *Aeromonas* species in waters with different levels of pollution. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 71, n. 2, p. 182-186, 1991.

ARAUJO, R. M.; ARRIBAS, R. M.; LUCENA, F.; PARES, R. Relation between *Aeromonas* and faecal coltforms in fresh waters. **Journal of Applied Bacteriology**, v.67, n. 2, p. 213-217, 1989.

AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. "**Fish pathogens diseases in farmed and wild**". Chichester, UK : Ellis Horwood, 1993. 123p.

AUSTIN, D. A.; ROBERTSON, P. A. W.; WALLACE, D. K.; DASKALOV, H.; AUSTIN, B. Isolation of *Aeromonas salmonicida* in association with purple-pigmented bacteria in sediment from a Scottish loch. **Letters in Applied Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 349–351, 1998.

AZEVEDO, V. M.; MORITA, M.; DROPA, M.; CABIANCA, M. A. DE A.; ESTEVES, K. E.; MATTÉ, G. R.; MATTÉ, M. H. Ocorrência de *Aeromonas spp.* e *Vibrio cholerae* em pesque-pagues da região metropolitana de São Paulo. **Revista Eletrônica de Epidemiologia das Doenças Transmitidas por Alimentos - REVNET DTA**, v. 3, n. 4, p. 114-119, 2003.

BANCESCU, G.; DUMITRIU, S.; BANCESCU, A.; DEFTA, C.; PANA, M., IONESCU, D.; ALECU, S.; ZAMFIRESCU, M. Susceptibility testing of *Streptococcus mitis* group isolates. **Indian Journal of Medical Research**, v. 119 (Suppl), p. 257-261, 2004.

BARCELLOS, L. J. G.; KREUTZ, L. C.; RODRIGUES, L. B.; SANTOS, L. R. DOS; MOTTA, A. C. DA; RITTER, F.; BEDIN, A. C.; SILVA, L. B. DA. *Aeromonas hydrophila* em *Rhamdia quelen*: aspectos macro e microscópico das lesões e perfil de resistência a antimicrobianos. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34, n. 3, p. 355-363, 2008.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardised single disk method. **American Journal Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BIZANI, D.; BRANDELLI, A. Antimicrobial susceptibility, hemolysis, and hemagglutination among *Aeromonas spp.* isolated from water of a bovine abattoir. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p.334-339, 2001.

BORGER, I. L.; D'OLIVEIRA, R. E. C.; CASTRO, A. C. D. DE; MONDINO, S. S. B. DE. *Streptococcus agalactiae* em gestantes: prevalência de colonização e avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 10, p. 575-579, 2005.

BRANDI, G.; SISTI, M.; GIARDINI, F.; SCHIAVANO, G. F.; ALBANO, A. Survival ability of cytotoxic strains of motile *Aeromonas* spp. in different types of water. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, p. 211–215, 1999.

BRASIL. **Resolução nº 357 de 17 de março de 2005**. CAPÍTULO I, Art. 2º, parágrafo I e Cap II, Seção I, Art. 4º. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Publicação DOU n. 53 de 18/03/2005, p. 58-63. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>>.

BRAVO, L. T. GONZÁLES, D. A. P.; MALVÁEZ, M. M. G.; PIMENTEL M. F.; SEGURA, R. M. Aislamiento de aeromonas productoras de aerolisina y enterotoxina, em muestras de agua potable em la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y otras dependencias de la Universidad. **Bioquimia**, v. 30, n. 1 p. 23-29. 2005.

BUENO, G. W.; MARENGONI, N. G.; GONÇALVES JÚNIOR, A. C.; BOSCOLO, W. R. E TEIXEIRA, R. DE A. Estado trófico e bioacumulação do P-total no cultivo de peixes em tanques-rede na área aquícola do reservatório de Itaipu. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 30, n. 3, p. 237-243, 2008.

CALOMIRIS, J. J.; ARMSTRONG, J. L.; SEIDLER, R. J. Association of metal tolerance with multiple antibiotic resistance of bacteria isolated from drinking water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 6. p. 1238-1242. 1984.

CARNAHAN, A. M.; MARI, M. A.; FANNING, G. R.; PASS, M. A.; JOSEPH, S. W. Characterization of *Aeromonas schubertii* strains recently isolated from traumatic wound Infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 8, p. 1826-1830, 1989.

CARNAHAN, A.; FANNING, G. R.; JOSEPH, S. W. *Aeromonas jandaei* (Formerly Genospecies DNA Group 9 *A. sobria*), a new sucrose-negative species isolated from clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 560-564, 1991.

CASTRO-ESCARPULLI, G.; FIGUERAS, M. J.; AGUILERA-ARREOLA, G.; SOLER, L.; FERNÁNDEZ-RENDÓN, E.; APARICIO, G. O.; A, GUARRO, J.; CHACÓN, M. R.

Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. **International Journal of Food Microbiology**, v. 84, p. 41– 49, 2003.

CHACÓN, M. R.; FIGUERAS, M.; CASTRO-ESCARPULLI, G.; SOLER, L.; GUARRO, J. Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 84, n. 4, 2003.

CHENG, W.; LIU, C. H.; CHEN, J. C. Effect of dissolved oxygen on the immune response of *Halotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. **Aquaculture**, v. 232, n.1-4, p. 103-115, 2004.

CHO, J. H.; SUNG, B. H.; KIM, S. C. Buforins: histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1788, n. 8, p. 1564-1569, 2009.

CIPRIANO, R. C.; BULLOCK, G. L. Furunculosis and other diseases caused by *Aeromonas salmonicida*. **Revision of Fish Disease Leaflet**, 66, 2001.

COLORNI, A.; RAVELO, C.; ROMALDE, J. L.; TORANZO, A. E.; DIAMANT, A. *Lactococcus garvieae* in wild red sea wrasse *Coris aygula* (Labridae). **Diseases of aquatic organisms**, v. 56, n. 3, p. 275–278, 2003.

COLWELL, R. R.; MACDONELL, M. T.; LEY, J. DE. Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam. nov. **International Journal of Systematic and Bacteriology**, v. 36, n. 3, p. 473-477, 1986.

CONROY, G.; CONROY, D. A. Bacterial Haemorrhagic Septicaemia in tilapias - **Aquaculture Health International**, v. 7, p. 7-8, 2006.

CORRELL, D. L. The role of phosphorus in the eutrophication of receiving waters: A review. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 27, p. 261-266, 1998.

DAVIES, J., BURKITT, M. D.; WATSON, A. Ascending cholangitis presenting with *Lactococcus lactis cremoris* bacteraemia: a case report. **Journal of Medical Case Report**, v. 3, n. 3, p. 2009.

DI BARI, M.; HACHICH, E. M.; MELO, A. M. J.; SATO, M. I. Z. *Aeromonas* spp. and microbial indicators in raw drinking water sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 516-521, 2007.

DUARTE, R. S.; BARROS, R. R.; FACKLAM, R. R.; TEIXEIRA, L. M. Phenotypic and genotypic characteristics of *Streptococcus porcinus* isolated from human sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4592–4601, 2005.

EL-SHAFI, S. A.; GIJZEN, H. J.; NASR, F. A; EL-GOHARY, F. A. Microbial quality of tilapia reared in fecal-contaminated ponds. **Environmental Research**, v. 95, n.2, p. 231-238, 2004.

ESPOSTO, E. M. SILVA, W. C. P.; REIS, C. M. F.; M REIS, E. M. F.; RIBEIRO, R. V.; RODRIGUES, D. P.; LÁZARO, N. S. Enteropatógenos bacterianos em peixes criados em uma estação de reciclagem de nutrientes e no ecossistema relacionado. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 4, 2007.

EVANS, J. J.; BOHNSACK, J. F.; KLESIUS, P. H.; WHITING, A. A.; GARCIA, J. C.; SHOEMAKER, C. A.; TAKAHASHI, S. Phylogenetic relationships among *Streptococcus agalactiae* isolated from piscine, dolphin, bovine and human sources: a dolphin and piscine lineage associated with a fish epidemic in Kuwait is also associated with human neonatal infections in Japan. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p.1369-1376, 2008.

EVANS, J. J.; KLESIUS, P. H.; GILBERT, P. M.; SHOEMAKER, C. A.; AL SARAWI, M. A.; LANDSBERG, J.; DUREMDEZ, R.; MARZOUK, A. AL; ZENKI, S. AL. Characterization of  $\beta$ -haemolytic Group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. **Journal of Fish Diseases**, v. 25, n. 9, p. 505–513, 2002.

EVANS, J. J.; KLESIUS, P. H., PASNIK, D. J.; BOHNSACK F. J. HUMAN *Streptococcus agalactiae* isolate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 5, p. 774-776, 2009.

EVANS, J. J.; KLESIUS, P. H.; SHOEMAKER, C. A.; PASNIK, D. J. Identification and epidemiology of *Streptococcus iniae* and *S. agalactiae* in tilapias *Oreochromis* spp. **Proceedings 7th International Symposium on Tilapia in Aquaculture**. September 6-8, 2006. Veracruz, Mexico. p. 25-42, 2006-a.

EVANS, J. J.; PASNIK, D. J.; KLESIUS, P. H.; AL-ABLANI, S. First report of *Streptococcus agalactiae* and *Lactococcus garvieae* from a wild bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 42, n. 3, p. 561–569, 2006b.

EVANS, J. J.; SHOEMAKER, C. A.; KLESIUS, P. H. Effects of sublethal dissolved oxygen stress on blood glucose and susceptibility to *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.15, n. 3, p. 202–208. 2003. Resumo.

FACKLAM, R. What Happened to the Streptococci: Overview of taxonomic and nomenclature changes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 4, p. 613–630, 2002.

FACKLAM, R.; ELLIOTT, J.; PIGOTT, N.; FRANKLIN, A. R. Identification of *Streptococcus porcinus* from human sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 385–388, 1995.

FACKLAM, R.; ELLIOTT, J.; SHEWMAKER, L.; ART, R. Identification and characterization of sporadic isolates of *Streptococcus iniae* isolated from humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 933–937, 2005.

FAO anuario. **Estadísticas de pesca y acuicultura**. 2007. Roma, FAO. 2009. p 24-26, 72p. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/012/i1013t/i1013t.pdf>. Acesso em: 27 ago. 2010.

FIGUEIREDO, H. C. P.; CARNEIRO, D. O.; FARIA, F. C.; COSTA, G. M. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-nilo



(*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 4, p. 678-680, 2006.

FIGUERAS, M. J.; SOLER, L.; CHACO, M. R.; GUARRO, J.; MARTINEZ-MURCIA, A. J. Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA RFLP analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 2069–2073. 2000.

FIGUERAS, M. J.; SUAREZ-FRANQUET, A.; CHACON, M. R.; SOLER, L.; NAVARRO, M.; ALEJANDRE, C.; GRASA, B.; MARTINEZ-MURCIA, A. J.; GUARRO, J. First record of the rare species *Aeromonas culicicola* from a drinking water supply. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 538–541, 2005.

FORTIN, M.; MESSIER, S.; PARE, J.; HIGGINS R. Identification of catalase-negative, non-Beta-hemolytic, Gram-positive, cocci isolated from milk samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 106–109, 2003.

FRANCIS-FLOYD, R. **Dissolved Oxygen for Fish Production**. FA 27, one of a series of the Department of Fisheries and Aquaculture, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. First published: September 1992. **Reviewed: February 2003**. < <http://edis.ifas.ufl.edu/fa002>>. Acesso em 02 ago. 2009.

FRANCIS-FLOYD, R. **Aeromonas Infections**. FA14. Série da Pesca e Ciências Aquáticas Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Original publicado em junho, 1991. **Revisado Maio de 2009**. < <http://edis.ifas.ufl.edu/fa042>>. Acesso em 02 ago.2009.

FRANCIS-FLOYD, R.; WATSON, C.; PETTY, D.; POWDER, D. B. **Ammonia in Aquatic Systems**. FA 16. This document is Fact Sheet. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. **Revisado: fevereiro de 2005**. Disponível em:< [http://edis.ifas.ufl.edu/fa031#FOOTNOTE\\_1](http://edis.ifas.ufl.edu/fa031#FOOTNOTE_1)>. Acesso em 05 set. 09.

GAUDREAU, C.; LECOURE, R.; ISMAÏL, J.; GAGNON, S.; JETTÉ, L.; ROGER, M. Prosthetic hip joint infection with a *Streptococcus agalactiae* isolate not susceptible to penicillin G and ceftriaxone. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 594-595, 2010.

GAVRIEL, A. A.; LANDRE, J. P. B; LAMB, A. J. Incidence of mesophilic *Aeromonas* within a public drinking water supply in north-east Scotland. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, n.3, p. 383–392. 1998.

GHENGHESH, K. S.; EL-GHODBAN, A.; DKAKNI, R.; ABEID, S.; ALTOMI, A.; TARHUNI, A.; MARIALIGETI, K. Prevalence, species differentiation, haemolytic activity, and antibiotic susceptibility of aeromonads in untreated well water. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 2, p. 169-173. 2001.

GOLTERMAN, H. L.; CLYMO, R. S.; OHNSTAD, M. A. M. **Methods for physical and chemical analysis of fresh water**. London: Blackwell Scientific Publication. 213p. 1978.

GOMES, M. J. P. Gênero *Streptococcus* spp. Bacteriologia. **Microbiologia Clínica. LABACVET**, 2008. Disponível em: [http://www.ufrgs.br/labacvet/pdf/streptococcus\\_2008-2.pdf](http://www.ufrgs.br/labacvet/pdf/streptococcus_2008-2.pdf). Acesso em 18 set. 2009.

GOÑI-URRIZA, M.; PINEAU, L.; CAPDEPUY, M.; ROQUES, C.; CAUMETTE, P.; QUENTIN, C. Antimicrobial resistance of mesophilic *Aeromonas* spp. isolated from two European Rivers. **Journal of Antimicrobial Chomotherapy**, v. 46, p. 297-301, 2000.

GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ N.; SANTOS J. A; OTERO A.; GARCÍA-LÓPEZ M. L. Cell-associated hemolytic activity in environmental strains of *Plesiomonas shigelloides* expressing cell-free, iron-influenced extracellular hemolysin. **Journal of food protection**, v. 70, n. 4, p. 885-90, 2007.

GONZALEZ-SERRANO, C. J., SANTOS, J. A., GARCIA-LOPEZ, M. L.; OTERO, A. Virulence markers in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biovar sobria

isolates from freshwater fish and from a diarrhoea case. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 414–419, 2002.

GUO, L.; LI, Z. Effects of nitrogen and phosphorus from fish cage-culture on the communities of a shallow lake in middle yangtze river basin of China. **Aquaculture**, n. 226, p. 201-212, 2003.

GUO, L.; LI, Z.; XIE, P.; NI, L. Assessment effects of cage culture on nitrogen and phosphorus dynamics in relation to fallowing in a shallow lake in China. **Aquaculture International**, v.17, n. 3, p. 229-241, 2009.

HARGREAVES, J. A. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. Review. **Aquaculture**, v. 166, n. 3-4, p. 181–212, 1998.

HAZEN, T. C.; FLIERMANS, C. B.; HIRSCH, R. P.; ESCH, G. W. Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 36, n. 5, p. 731-738, 1978.

HIRANSUTHIKUL, N., TANTISIRIWAT, W.; LERTUTSAHAKUL, K.; VIBHAGOOL. A.; BOONMA, P. Skin and soft-tissue infections among tsunami survivors in southern Thailand. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 10, p. 93-96, 2005.

HIRSCH, D.; PEREIRA JÚNIOR, D. J.; LOGATO, P. V. R.; PICCOLI, R. H.; FIGUEIREDO, H. C. P. Identificação e resistência antimicrobiana de espécies móveis de *Aeromonas moveis* isoladas de peixes e ambientes aquáticos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 6, p. 1211-1217, 2006.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 9th ed. Lippincott, Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

HUNT, M. E.; RICE, E. W. Microbiological examination. In: EATON et al. (Eds), **Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater**, 21st Ed. Washington, D.C.: American Public Health Association (APHA), American Water Works

Association (AWWA & Water Environment Federation (WEF), 2005. Part 9000, p. 9.1-9.169.

HUSS, H. H. **Assessment and management of seafood safety and quality**. FAO FISHERIES TECHNICAL. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Veterinary drugs, Rome, 2003, 444p. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/006/y4743e/y4743e00.htm#Contents>. Acesso em 10 jun. 2007.

JAFAR, Q. A.; SAMEER, A.Z.; SALWA, A. M.; SAMEE, A. A.; AHMED, A. M.; AL-SHARIFI, F. Molecular investigation of *Streptococcus agalactiae* isolates from environmental samples and fish specimens during a massive fish kill in Kuwait Bay. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 1, p. 22-26, 2009.

KÄMPFER, P.; CHRISTMANN, C.; SWINGS, J.; HUYS, G. In vitro susceptibilities of *Aeromonas* genomic species to 69 antimicrobial agents. **Systematic and applied microbiology**, v. 22, n. 4, p. 662-9. 1999.

KAWAMURA, Y.; FUJIWARA, H.; MISHIMA, N.; TANAKA, Y.; TANIMOTO, A.; IKAWA, S.; ITOH, Y. AND EZAKI, T. First *Streptococcus agalactiae* isolates highly resistant to quinolones, with point mutations in *gyrA* and *parC*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 11, p. 3605–3609, 2003.

KO, W. C.; YU, K. W.; LIU, C. Y.; HUANG, C. T.; LEU, H. S.; CHUANG, Y. C. Increasing antibiotic resistance in clinical isolates of *Aeromonas* strains in Taiwan. **Antimicrob. Agents and Chemother**, v. 40, p. 1260-1262, 1996.

KOROLEFF, F. Determination of nutrients. In: GRASSHOFF, K. (Ed.). **Methods of Seawater Analysis**. Verlag Chemie Weinheim: 1976. p.117-181.

KOZINSKA, A. Dominant pathogenic species of mesophilic aeromonads isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. **Journal of Fish Diseases**, v. 30, p. 293-301, 2007.

KUBITZA, F. **Qualidade da água na produção de peixes**. 3. ed. Jundiaí: Degaspari. 97p. 1999.

KUBITZA, F. Manejo nutricional e alimentar de tilápias. **Revista Panorama da Aquicultura**, Jundiaí, SP, v. 10, n. 60, p. 31-36, 2000.

KUBITZA, F. **Qualidade da água no cultivo de peixes e camarões**. 1 ed. Jundiaí-SP: ND-Acqua Supre, 2003. 229p.

KÜHN, I. ; LLESTAM, G.; HUYS, G.; JANSSEN, P.; KERSTERS, K.; KROVACEK, K.; STENSTRÖM, T.A. Diversity, persistence, and virulence of *Aeromonas* strain isolated from drinking water distribution systems in Sweden. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 2708-2715, 1997.

LANCEFIELD, R. C. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic Streptococci. **Journal of Experimental Medicine**, v. 57, n. 4, p. 571-595. 1933.

LAU, S. K.; WOO, P. C.; TSE, H.; LEUNG, K. W.; WONG, S. S.; YUEN, K. Y. Invasive *Streptococcus iniae* infections outside North America. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 1004-9, 2003.

LIMA, R. M. S.; FIGUEIREDO, H. C. P.; FARIA, F. C. DE; PICOLLI, R. H.; FILHO, J. S. DE S. B.; LOGATO, P. V. R. Resistência a antimicrobianos de bactérias oriundas de ambiente de criação e filés de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Ciência e agrotecnologia**, v. 30, n. 1, p. 126-132, 2006.

LÖSCH, L. S.; MERINO, L. A.; ALONSO, J. M. Estudio del perfil de sensibilidad antibiótica en especies de la familia Enterobacteriaceae aisladas de fuentes de agua de la provincia del haco. Universidad Nacional del Nordeste. **Comunicaciones Científicas y Tecnológicas**. 2006. Disponível em:< <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt2006/03-Medicinas/2006-M-022.pdf>>. Acesso em: 24/08/09.

MAALEJ, S.; MAHJOUBI, A.; ELAZRI, C. DUKAN, S. Simultaneous effects of environmental factors on motile *Aeromonas* dynamics in an urban effluent and in the natural seawater. **Water Research**, v. 37, n. 12, p. 2865-2874, 2003.

MÃMAR, R. M.; CYRINO, J. E. P. Piscicultura. Governo do estado de São Paulo, Secretaria da Agricultura, Campinas, São Paulo: CATI, 1988, 102 p.

MARQUES, P. P. A Água em Revista. **Revista Técnica e Informática da CPRM**, Ano I, n.1, p.35-42, nov. 1993.

MARTÍNEZ-MURCIA, A. J.; SAAVEDRA, M. J.; MOTA, V. R.; MAIER, T.; STACKEBRANDT, E.; COUSIN, S. *Aeromonas aquariorum* sp. nov., isolated from aquaria of ornamental fish. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 58, n. 5, p. 1169-75, 2008.

MARTINS, A. G. L. DE A. **Efeitos da emissão dos efluentes domésticos na proliferação de *Aeromonas* sp. em águas de superfície e pescado do estuário do rio Bacanga. São Luís/MA.** Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2005. 107 p. Dissertação (Mestrado Instituto de Ciências do Mar). Fortaleza, 2005.

MARTINS, A. G. L. DE A.; NASCIMENTO, A. R.; VIEIRA, R. H. S. DOS F.; SERRA, J. L.; ROCHA, M. M. R. M. Quantificação e identificação de *Aeromonas* spp. em águas de superfície do estuário do rio Bacanga em São Luís / MA (BRASIL). **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos - CEPPA**, Curitiba, v. 27, n. 1, p. 107-118, 2009.

MARTINS, M. L.; MIYAZAKI, D. M. Y.; MOURIÑO, J. L. P. *Aeromonas caviae* durante surto de mortalidade em tilápias do Nilo e suplementação com vitamina C na dieta. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 585-590, 2008.

MATA, A.; GIBELLO, I.; CASAMAYOR, A. A.; BLANCO, M. M; DOMÍNGUEZ, L.; FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J. F. Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water Streptococcosis in fish. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 5. p. 3183–3187, 2004.

MATOS, A. T. Contaminação de mananciais de água com resíduos de atividades agropecuárias. In: I Encontro de preservação de mananciais da zona da mata mineira,

2001, Viçosa-MG. **Anais** do I Encontro de Preservação de Mananciais da Zona da Mata Mineira, v. 1. p. 66-69, 2001.

MERCANTE, C. T. J.; COSTA, S. V.; SILVA, D. DA; CABIANCA, M. A.; ESTEVES, K. E. Qualidade da água em pesque-pague da região metropolitana de São Paulo (Brasil): avaliação através de fatores abióticos (período seco e chuvoso). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 27, n. 1, p. 1-7, 2005.

MOLINARI, L. M.; SCOARIS, D. DE O.; PEDROSO, R. B.; BITTENCOURT, N. DE L. R.; NAKAMURA, C. V.; UEDA-NAKAMURA, T.; ABREU FILHO, B. A. DE; DIAS FILHO, B. P. Bacterial microflora in the gastrointestinal tract of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, cultured in a semi-intensive system. **Acta Scientiarum. Biological Sciences Maringá**, v. 25, n. 2, p. 267-271, 2003.

MONFORT, P.; BALEUX, B. Dynamics of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, and *Aeromonas caviae* in a sewage treatment pond. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 7, p. 1999-2006, 1990.

MONFORT, P.; BALEUX, B. Distribution and survival of motile *Aeromonas* spp. in brackish water receiving sewage treatment effluent. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 9, p. 2459–2467, 1991.

MORALES, G.; BLANCO, L.; ARIAS, M. L.; Y CHAVES, C. Evaluación de la calidad bacteriológica de tilapia fresca (*Oreochromis niloticus*) proveniente de la Zona Norte de Costa Rica. **Sociedad Latinoamericana de Nutrición**, v. 54, n. 4, 2004.

NAKANO, H.; KAMEYAMA, T.; VENKATESWARAN, K.; KAWAKAMI, H.; HASHIMOTO, H. Distribution and characterization of hemolytic, and enteropathogenic motile *Aeromonas* in aquatic environment. **Microbiology and Immunology**, v. 34, n. 5, p. 447-58, 1990.

NCCLS/CLSI - **National Committee for Clinical Laboratory Standards/Clinical and Laboratory Standards Institute**. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S15

(ISBN 1-56238-556-9). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2005.

NIZET, V. Streptococcal  $\beta$ -hemolysins: genetics and role in disease pathogenesis. **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 12, p. 575-580, 2002.

NOBREGA NETTO, L. DA. *Streptococcus iniae* e *Streptococcus dysgalactiae* associados à meningoencefalite em tilápias do Nilo no Brasil. Lavras: UFLA, 2009. 44 p. Dissertação (Mestrado), Universidade federal de Lavras, Lavras, 2009.

OGAWA, M.; MAIA, E. L. **Manual de Pesca**. São Paulo: Varela. 1999. 464p.

OROZOVA, P.; BARKER, M.; AUSTIN, D. A.; AUSTIN, B. Identification and pathogenicity to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), of some aeromonads. **Journal of fish diseases**, v. 32, n. 10, p. 865-71, 2009.

PEREIRA JR., D. J.; FIGUEIREDO H. C. P.; CARNEIRO, D. O.; LEAL, C. A. G. Concentração inibitória mínima de oxitetraciclina para isolados de *Aeromonas hydrophila* obtidos de diferentes fontes. **Ciência agrotécnica**, v. 30, n.6, p. 1190-1195, 2006.

PEREIRA, L. P. F.; MERCANTE, C. T. J. A amônia nos sistemas de criação de peixes e seus efeitos sobre a qualidade da água. Uma revisão. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.31, n.1, p. 81-88, 2005.

PIER, G. B.; MADIN, S. H.; AL-NAKEEB, S. *Streptococcus iniae* sp. nov. , a Beta-hemolytic *Streptococcus* isolated from an amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 26, n.4, p. 545-553, 1976.

POSSANTE, A.; MESQUITA, C.; JUMPE, R.; FREITAS, R.; FERREIRA, T. **Rastreo e vacinação em aquacultura das espécies dourada e robalo face à infecção com *Streptococcus iniae* (Pier & Madin, 1976)**. Universidade do Algarve (UALG), Faro. Curso de Biologia Marinha e Pescas (FCMA), 2004.

PRESLEY, S.; RAINWATER, T. R.; AUSTIN, G. P.; PLATT, S. G.; ZAK, J. C.; COBB, G. P.; MARSLAND, E. J. ; TIAN, K.; ZHANG, B.; ANDERSON, T. A.; COX, S. B.;



ABEL, M. T.; LEFTWICH, B. D.; HUDDLESTON, J. R.; JETER, R. M.; KENDALL, R. J. Assessment of pathogens and toxicants in New Orleans, LA. Following hurricane Katrina. **Environmental Science & Technology**, n. 40, p. 468-474, 2006.

PULIDO, A.; IREGUI, C.; FIGUEROA, J.; KLESIOUS, P. Estreptococosis en tilapias (*Oreochromis* spp.) cultivadas em Colombia. **Revista AquaTIC**, n. 20, p. 97-106, 2004.

RAHMAN, M.; COLQUE-NAVARRO, P.; KÜHN, I. HUYS, G.; SWINGS, J.; MÖLLBY, R. Identification and characterization of pathogenic *Aeromonas veronii* Biovar sobria associated with epizootic ulcerative syndrome in fish in Bangladesh. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 650–655, 2002.

REITH, M. E.; SINGH, R. K.; CURTIS, B.; BOYD, J. M.; BOUEVITCH, A.; KIMBALL, J.; MUNHOLLAND, J.; MURPHY, C.; SARTY, D.; WILLIAMS, J.; NASH, J. H.E.; JOHNSON, S. C. AND BROWN, L. L. The genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449: insights into the evolution of a fish pathogen. **BMC Genomics**, v. 9, n. 427, p. 2-15, 2008.

RIPPEY, S. R.; CABELLI, V. J. Growth characteristics of *Aeromonas hydrophila* in limnetic waters of varying trophic state. **Archiv für Hydrobiologie**, v. 104, n. 3, p. 311-9. 1985.

RIPPEY, S. R.; TROY, M. A.; CABELLI, V. J. Growth kinetics of *Aeromonas hydrophila* in freshwaters supplemented with various organic and inorganic nutrients. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 10, p. 159-164, 1994.

ROMALDE, J. L.; RAVELO, C.; VALDÉS, I.; MAGARIÑOS, B.; FUENTE, E. DE LA.; SAN MARTÍN, C.; AVENDAÑO-HERRERA, R.; TORANZO, A. E. *Streptococcus phocae*, um patógeno emergente para a cultura de salmonídeos. **Veterinary Microbiology**, v. 130, n. 1-2, p. 198-207, 2008.

ROMANO, L. A.; MEJÍA, J. Infección por *Streptococcus iniae*: Una enfermedad emergente que afecta a peces de cultivo y a humanos. **Revista AquaTIC**, n. 18, p. 25-32, 2003.

SALVADOR, R.; MULLER, E. E.; LEONHARDT, J. H.; PRETTO-GIORDANO, L. G.; DIAS, J. A.; FREITAS, J. C. DE; MORENO, A. M. Isolamento de *Streptococcus* spp de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) e qualidade da água de tanques-rede na Região Norte do Estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 35-42, 2003.

SALVADOR, R.; MULLER, E. E.; FREITAS, J. C. DE; LEONHARDT, J. H.; PRETTO-GIORDANO, L. G.; DIAS, J. A. Isolation and characterization of *Streptococcus* spp. group B in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Parana State, Brazil. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1374-1378, 2005.

SANTOS, J. A., GONZÁLEZ, C. J., OTERO, A.; GARCÍA-LÓPEZ, M. L. Hemolytic Activity and Siderophore Production in Different *Aeromonas* Species Isolated from Fish. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, n. 12, p. 5612-5614, 1999.

SCHAFFER, I.; ROHRBACHER, L. DE O.; COLLA, N. C. Identificação dos gêneros bacterianos presentes em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) cultivadas na serra catarinense. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 3, n. 1, p. 56-61, 2004.

SCHRAG, S.; GORWITZ, R.; FULTZ-BULTZ, K.; SCHUCHAT, A. Prevention of perinatal group B Streptococcal disease: Revised guidelines from CDC. **Recommendations and Reports**, v. 51(RR-11), p. 1-22, 2002. Disponível em: [www.cdc.gov/mmwr/preview/.../rr5111a1.htm](http://www.cdc.gov/mmwr/preview/.../rr5111a1.htm). Acesso em 23/06/2007.

SCHUBERT, R. H.; MATZINO, D. Temperature as an environmental factor influencing the pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. **Zentralbl Bakteriol.** v. 273, n. 3, p. 327-31, 1990.

SCOARIS, D. DE O.; BIZERRA, F. C.; YAMADA-OGATTA, S. F.; ABREU FILHO, B. A. DE; UEDA-NAKAMURA, T. NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. The occurrence of *Aeromonas* spp. in the bottled mineral water, well water and tap water from the

municipal supplies. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 51, n. 5, p. 1049-1055, 2008.

SEETHALAKSHMI, I.; SUBASHKUMAR, R.; SAMINATHAN, P. Distribution of putative virulence genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida* isolated from marketed fish samples. **Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v. 3, n. 2, p. 145-151, 2008.

SESHADRI, R.; JOSEPH, S. W.; CHOPRA, A. K.; SHA, J.; S. JONATHAN; GRAF, J.; HAFT, D.; WU, M.; REN, Q. ROSOVITZ, M. J.; MADUPU, R.; TALLON, L.; KIM, M.; JIN, S.; VUONG, H.; STINE O. C.; ALI, A.; HORNEMAN, A. J.; HEIDELBERG, J. F. Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966<sup>T</sup>: Jack of all trades. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 23, p. 8272–8282, 2006.

SHEWMAKER, P. L.; CAMUS, A. C.; BAILIFF, T.; STEIGERWALT, A. G.; MOREY, R. E.; CARVALHO, M. DA G. S. *Streptococcus ictaluri* sp. nov., isolated from channel catfish *Ictalurus punctatus* broodstock. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 1603–1606, 2007.

SINGH, D. V.; SANYAL, S. C. Virulence patterns of *Aeromonas eucrenophila* isolated from water and infected fish. **Journal of Diarrhoeal Diseases Research**, v. 17, n. 1, p. 37-42, 1999.

SHOEMAKER, C. A.; EVANS, J. J.; KLESIUS, P. H. Density and dose: factors affecting mortality of *Streptococcus iniae* infected tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 188, n. 3-4, p. 229-235, 2000.

SMITH, A. J.; JACKSON, M. S. Susceptibility of viridans group streptococci isolated from dento-alveolar infections to eight antimicrobial agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. Advance Access publication, p. 1045-1046, 2003.

SOLER, L.; FIGUERAS, M. J.; CHACÓN, M. R.; VILA, J.; MARCO FRANCESC; MARTINEZ-MURCIA, A. J.; GUARRO, J. Potential virulence and antimicrobial

susceptibility of *Aeromonas popoffi* recovered from freshwater and seawater. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 32, p. 243-247, 2002.

SOUSA, J. A. DE; SILVA-SOUZA, A. T. Bacterial community associated with fish and water from congonhas river, Sertaneja, Paraná, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 44, n. 4, p. 373-381, 2001.

TAN, Z.; KOMAR, C.; ENRIGHT, W. J. Health management practices for cage aquaculture in Asia - a key component for sustainability. **Intervet Aquatic Animal Health**, n. 13, p. 7-14, 2006.

TEIXEIRA, C. D.; NEVES, F. P. G.; ROCHA, F. S. P. DA; MONDINO, S. S. B. DE. *Lactococcus garvieae*: isolamento e caracterização fenotípica. **Revista Brasileira Análises Clínicas**, v. 41, n. 3, p. 205-207, 2009.

TOKAJIAN, S.; HASHWA, F. Phenotypic and genotypic identification of *Aeromonas* spp. isolated from a chlorinated intermittent water distribution system in Lebanon. **Journal of Water and Health**, v. 2, p. 115-22, 2004.

TORANZO, A. E.; NOVOA, B.; ROMALDE, J. L.; NUÑEZ, S.; DEVESA, S.; MARIÑO, E.; SILVA, R.; MARTÍNEZ, E.; FIGUERAS, A.; BARJA, J. L. Microflora associated with healthy and diseased turbot (*Scophthalmus maximus*) from three farms in northwest Spain. **Aquaculture**, v. 114, p. 189-202, 1993.

TORRES, S. M.; ROSA, C.; THOMAS, J. J. Criação de camarão da Malásia (*Macrobrachium rosenbergui*) em escala comercial. Rio de Janeiro, 1992.

VADIVELU, J., PUTHUCHEARY, S.D., PHIPPS, M.; CHEE, Y.W. Possible virulence factors involved in bacteraemia caused by *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 42, p.171-174, 1995.

VALLY, H.; WHITTLE, A.; CAMERON, S.; DOWSE G. K.; WATSON, T. Outbreak of *Aeromonas hydrophila* wound infections associated with mud football. **Clinical Infectious Diseases**; v. 38, n. 8, p. 1084-9, 2004.

VENDRELL, D.; BALCÁZAR, J. L.; RUIZ-ZARZUELA, I.; BLAS, I. DE.; GIRONÉS, O.; MÚZQUIZ, J. L. *Lactococcus garvieae* in fish: A review **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 29, n. 4, p. 177-198, 2006.

VIANNI, M. C. E.; LÁZARO, N. S. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos em amostras de cocos Gram-positivos, catalase negativos, isoladas de mastite subclínica bubalina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 2, p. 47-51, 2003.

WANG, G.; CLARK, C. G.; LIU, C.; PUCKNELL, C. MUNRO, C. K.; KRUK, T. M. A. C.; CALDEIRA, R.; WOODWARD, D. L.; RODGERS, F. G. Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *A. sobria* by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 1048–1054, 2003.

WARREN, W. J.; JETER, R. M. KIMBROUGH, R. C.; ZAK, J. C. Population patterns and antimicrobial resistance of *Aeromonas* in urban playa lakes. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 397–404, 2004.

WEINSTEIN, M. R.; LITT, M.; KERTESZ, D. A.; WYPER, P. ROSE, D.; COULTER, M.; MCGEER, A.; FACKLAM, R.; OSTACH, C.; WILLEY, B. M.; BORCZYK, A.; LOW, D. E. Invasive infections due to a fish pathogen, *Streptococcus iniae*. **New England Journal of Medicine**, v. 337, p. 589-594, 1997.

WELKER, T. L.; MCNULTY, S. T.; KLESZIUS, P. H. Effect of sub-lethal hypoxia on immune response and susceptibility of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, to enteric septicemia. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 38, n.1, p. 12–23, 2007.

WHO - **World Health Organization. Guidelines for drinking water quality, Addendum: Microbiological agents in drinking water**, 2nd Edition, Aeromonas. Current as of August 25, 2002, Oslo, Norway, 17p. Disponível em: <[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/microbioladd/en/index.html](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/microbioladd/en/index.html)>. Acesso em 04 ago. 2008.

YANONG, R. P. E.; FRANCIS-FLOYD, R. **Streptococcal Infections of Fish**. FA 057. Department of Fisheries and Aquatic Sciences, Institute of Food and Agricultural

Sciences, University of Florida. **Major revision: August 2006.** <<http://if-srvv-edis.ifas.ufl.edu/fa057>>. Acesso em 02 ago. 2009.

YU, H. B.; ZHANG, Y. L.; LAU, Y. L.; YAO, F.; VILCHES, S.; MERINO, S.; TOMAS, J. M.; HOWARD, S. P.; LEUNG, Y. Identification and characterization of putative virulence genes and gene clusters in *Aeromonas hydrophila* PPD134/91. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 8, p. 4469–4477, 2005.