

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

**ECOTOXICIDADE E EFICÁCIA DE SANITIZANTE NA
REDUÇÃO DE *Aeromonas hydrophila* NA ÁGUA DE CULTIVO
E PELE DE *Oreochromus niloticus***

Daniela Rodrigues Silva Basile
Médica Veterinária

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Dezembro de 2011

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

**ECOTOXICIDADE E EFICÁCIA DE SANITIZANTE NA
REDUÇÃO DE *Aeromonas hydrophila* NA ÁGUA DE CULTIVO
E PELE DE *Oreochromus niloticus***

Daniela Rodrigues Silva Basile

Orientador: Prof. Dr. Oswaldo Durival Rossi Junior

Co-orientador: Prof. Dr. Claudinei da Cruz

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Dezembro de 2011

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

DANIELA RODRIGUES SILVA BASILE – nascida em 18 de maio de 1984, no município de São José do Rio Preto, São Paulo. Ingressou no curso de Medicina Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal em março de 2004. Durante a graduação realizou trabalho de iniciação científica nas áreas de genética e patologia clínica veterinária como bolsista FAPESP, realizou estágios em laboratórios de microbiologia e indústrias de alimentos e participou de congressos. Fez estágio de graduação no laboratório de microbiologia de alimentos da Texas A&M University, em College Station-TX, nos EUA, onde desenvolveu pesquisa com irradiação de alimentos. Concluiu a graduação em dezembro de 2008, registrada no Conselho Regional de Medicina Veterinária de São Paulo sob o número CRMV-SP 29221. Recebeu o prêmio de melhor pôster apresentado no IAFP Europe Symposium, 2009, em Berlim. Iniciou o mestrado em Medicina Veterinária Preventiva pelo programa de pós-graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Campus de Jaboticabal em agosto de 2009 como bolsista pelo CNPq.

DEDICO

Aos meus queridos pais, Selma e Milton, que são o meu incentivo em tudo que faço, por me ensinarem o significado de determinação, humildade e amor.

À minha irmã, Nadine, pelo carinho e pelo simples fato de tê-la ao meu lado.

Ao meu esposo e melhor amigo, Aritana, por saber acalmar o meu espírito nos momentos de aflição, pela compreensão, companheirismo e amor.

“Quem quer fazer alguma coisa, encontra um meio.

Quem não quer fazer nada, encontra uma desculpa”

(Roberto Shinyashiki)

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, minha fortaleza, por sempre abençoar o meu caminho com pessoas maravilhosas que me ensinam a crescer e me tornar uma pessoa melhor a cada dia.

Ao **Prof. Dr. Oswaldo Durival Rossi Junior** pela orientação, compreensão, por ter aceito minhas idéias e pela confiança na realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador, **Prof. Dr. Claudinei da Cruz**, pela convivência que favoreceu agregação de conhecimentos e despertou a minha admiração e respeito, por acreditar em meu potencial e pela amizade.

Ao **Prof Dr. Luiz Augusto do Amaral, à Dra. Daniela Gomes da Silva e á Profa. Dra. Leticia Ane Sizuki Nociti** participantes da banca de qualificação e de defesa da dissertação, pelas importantes correções e sugestões fornecidas para esta pesquisa.

Ao **Prof. Dr Antonio Sérgio Ferraudo** pela orientação no delineamento estatístico.

Ao **Departamento de Patologia Veterinária**, pela doação da cultura de *Aeromonas hydrophila*

Aos funcionários, **Lila e Diba**, do laboratório de análise microbiológica de alimentos e água pela ajuda na realização e na compreensão das análises.

Ao **Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia (NEPEAM)** pela disponibilidade da estrutura, dos laboratórios e materiais para a realização de grande parte dos experimentos.

Aos meus amigos e companheiros do grupo NEPEAM, sem os quais a realização deste trabalho não seria possível: **Lê, Ronaldo, Dirso, Dorita, Pretinha, Cris, Neto, Milena Pancelli, Milena Chaguri, Joani, Alison, Japa, Kitinha, Luiz, Cynthia e as estagiárias Bruninha e Gessi**, pela imensa ajuda, amizade, e por todos os momentos de

alegria, risadas e aprendizados que compartilhamos juntos. Especialmente, agradeço aos pós-graduandos **Sílvia Patrícia Carraschi (Picola)** e **Roberto Barbuio (Só-dá)** pela ajuda, amizade e ensinamentos em todas as etapas deste estudo.

A minha grande amiga, **Juliana**, pela amizade sincera e pela incansável ajuda na realização das análises estatísticas.

Ao meu amigo pós graduando **Rafael (Jaspion)**, pelo auxílio durante as análises microbiológicas.

A todos os meus **amigos**, pelo apoio, carinho e compreensão.

Aos meus sogros, **Bibiana e Newton**, à minha cunhada **Dani** e ao seu noivo **Vergílio**, pelo apoio e amor.

Ao meu cunhado, **Mateus**, pelo carinho.

À minha **família**, que mesmo longe sempre está comigo.

Ao **Pandinha**, pelos momentos de alegria.

A **todas as pessoas** que contribuíram de alguma maneira com este trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1 Cadeia produtiva de pescados e sua relação com a saúde pública.....	4
3.2 Microrganismos patogênicos nos peixes e no ambiente aquático.....	5
3.2.1 <i>Aeromonas</i> spp.....	7
3.3 Toxicidade aguda de sanitizantes utilizados na cadeia produtiva de pescados.....	8
3.4 Avaliação de risco ambiental.....	10
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
4.1 Determinação da toxicidade aguda do sanitizante para a tilápia (<i>Oreochromus niloticus</i>).....	11
4.1.1 Aclimação, ensaios preliminares de toxicidade aguda e de sensibilidade.....	11
4.1.2 Ensaio definitivo de toxicidade aguda.....	12
4.2 Teste de ajuste de dose do sanitizante para a tilápia.....	13
4.3 Avaliação de risco ambiental.....	14
4.4 Avaliação da eficácia do sanitizante no controle de <i>A. hydrophila</i>	15
4.4.1 Protocolo de contaminação experimental da água do tanque de criação das tilápias e da pele dos peixes com <i>A. hydrophila</i> e montagem do experimento.....	15

4.4.3	Análise microbiológica da pele dos peixes.....	17
4.4.4.	Análise microbiológica da água.....	19
4.5	Análises estatísticas.....	19
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5.1	Toxicidade aguda do sanitizante para a tilápia.....	20
5.2	Teste de ajuste de dose do sanitizante para a tilápia.....	21
5.3	Risco ambiental do sanitizante para a tilápia.....	25
5.4	Avaliação da eficácia do sanitizante no controle de <i>A. hydrophila</i>	25
5.4.1	Análise microbiológica da água.....	25
5.4.2	Análise microbiológica da pele.....	29
5.5	Confirmação da espécie <i>A. hydrophila</i>	34
6	CONCLUSÕES	36
7	REFERÊNCIAS	37

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 . Classes de toxicidade aguda para organismos aquáticos.....	13
Tabela 2 Concentrações testadas do sanitizante e respectivos tempos de exposição.....	14
Tabela 3 Classes de risco ambiental de compostos tóxicos de acordo com os valores calculados do quociente Q (USEPA, 1998).....	15
Tabela 4 Porcentagem de sobrevivência de peixes com peso entre 25 e 60g (grupo A) durante três aplicações do sanitizante com intervalos de 24 horas.....	22
Tabela 5 Porcentagem de sobrevivência de peixes com peso entre 150 e 200g (grupo B) durante três aplicações do sanitizante com intervalos de 24 horas.....	24
Tabela 6 População de <i>A hydrophila</i> (Log ₁₀ UFC) no decorrer do tempo para as concentrações do sanitizante a partir de análises microbiológicas da água de criação dos peixes.....	28
Tabela 7 População de <i>A hydrophila</i> (Log ₁₀ UFC) no decorrer do tempo para as concentrações do sanitizante a partir de análises microbiológicas da pele dos peixes.....	31

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Relação da concentração-resposta do sanitizante para a tilápia.....	21
Figura 2 Relação das concentrações aplicadas do sanitizante e a população de <i>A. hydrophila</i> em amostras de água. Médias acompanhadas de letras iguais não diferem entre si ($p>0,05$)...	26
Figura 3 Relação dos tempos de exposição do sanitizante e a redução da população de <i>A. hydrophila</i> em amostras de água. Médias acompanhadas de letras iguais não diferem entre si ($p>0,05$)...	27
Figura 4 Mapa percentual das concentrações do sanitizante e tempos de exposição em amostras de água de tilápia (<i>O. niloticus</i>) contaminada artificialmente com <i>A. hydrophila</i>	29
Figura 5 Relação das concentrações aplicadas do sanitizante e a população de <i>A. hydrophila</i> em amostras de pele de peixe. Médias acompanhadas de letras iguais não diferem entre si ($p>0,05$).....	30
Figura 6 Relação dos tempos de exposição do sanitizante e a população de <i>A. hydrophila</i> em amostras de pele de peixe. Médias no gráfico acompanhadas de letras iguais não diferem entre si ($p>0,05$).....	30
Figura 7 Relação das concentrações do sanitizante no decorrer dos tempos de exposição e a população de <i>A. hydrophila</i> em amostras de pele.....	32
Figura 8 Mapa perceptual das concentrações do sanitizante, tempos de exposição e concentrações de bactérias em amostras de pele de tilápia (<i>O. niloticus</i>) contaminada artificialmente com <i>A. hydrophila</i>	33

ECOTOXICIDADE E EFICÁCIA DE SANITIZANTE NA REDUÇÃO DE *Aeromonas hydrophila* NA ÁGUA DE CULTIVO E PELE DE *Oreochromus niloticus*

RESUMO – O objetivo do estudo foi determinar a toxicidade aguda do sanitizante (composto por glutaraldeído e cloreto de dimetil cocobenzil amônio) para tilápias (*Oreochromis niloticus*) e verificar a eficácia do produto utilizado na redução da população de bactérias do gênero *Aeromonas* presentes na pele dos peixes e na água de criação por contaminação experimental. Para os testes de toxicidade aguda, os animais foram expostos a 0,01, 0,02, 0,03 e 0,04 mL.L⁻¹ e um grupo controle. O produto foi classificado pela toxicidade aguda e pelo risco ambiental de acordo com as classes de valores da CL50;48 horas. Foram realizados testes de ajuste de dose do produto e determinação do limite de tempo de exposição em condições de campo. Para o teste de eficácia os peixes foram expostos a três concentrações do produto (0,01; 0,02 e 0,03 mL.L⁻¹) e um grupo testemunha nos seguintes tempos de exposição: zero, 20, 40 e 60 minutos. Amostras de água e pele dos animais foram coletadas ao final de cada tempo de exposição e submetidas às análises microbiológicas. A CL50;48h do produto foi de 0,02 mL.L⁻¹ e esta dose apresenta baixo risco de intoxicação ambiental para a tilápia (*O. niloticus*). A utilização do produto como sanitizante de peixes foi mais eficaz na redução da população de *A. hydrophila* da pele do peixe do que na água de criação e quando utilizado na concentração 0,03 mL.L⁻¹ ou 0,02 mL.L⁻¹ por 60 minutos de exposição reduziu quase 1,5 log UFC.mL⁻¹ na pele dos peixes

Palavras-chave: microbiologia; peixes de cultivo; bactérias.

ECOTOXICITY AND EFFECTIVENESS OF SANITIZER IN REDUCING POPULATION OF *Aeromonas hydrophila* PRESENT ON THE SKIN AND IN THE WATER CULTURE OF *Oreochromis niloticus*

SUMMARY - The aim of this study was determined to assess the acute toxicity of a sanitizer based on glutaraldehyde and cocobenzil dimethyl ammonium chloride compounds for tilapia (*Oreochromis niloticus*) and verify the effectiveness of the product used in the fish farm water on the reduction of the bacteria population of *Aeromonas hydrophila* presents on the skin of fish by experimental contamination. For acute toxicity tests, the animals were exposed to 0.01, 0.02, 0.03 and 0.04 mL.L⁻¹ of the tested product and a control group. The product was classified according the acute toxicity and the assessment risk classes. Tests were performed for dose adjustment of the product and determining the limit of exposure time under field conditions for fish weighing between 25 and 60 g and 150 and 200 g. This dose adjustment was based on checking the signs of intoxication of the animals during the exposure time to the product. To the effectiveness test, fish were exposed to three concentrations of the product (0.01, 0.02 and 0.03 mL.L⁻¹) and a control group (without administration of the product) in the following exposure times: zero, 20, 40 and 60 minutes. Water and skin samples were collected at the end of each exposure time and subjected to microbiological analysis. The LC₅₀;48h estimated of the product was 0.02 mL.L⁻¹ and it has been classified as extremely toxic and has a low risk of environmental poisoning tilapia (*O.niloticus*) when its concentrations is used. The use of concentrations 0.01, 0.02 and 0.03 mL.L⁻¹ for 60 minutes of exposure is considered safe for tilapia, regardless of the fish size. The use of this product as a fish sanitizer was more effective in reducing the population of *A. hydrophila* on the skin of the fish than in water when used in the water. The concentration 0.03 mL.L⁻¹ or 0.02 mL.L⁻¹ for 60 minutes of exposure reduced by almost 1.5 log UFC.mL⁻¹ in skin of fish.

Keywords: microbiology; fish, glutaraldehyde.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país com grande potencial para a produção de pescados e a piscicultura brasileira tem apresentado intensificação na produção nos últimos anos, sendo a tilápia (*Oreochromis niloticus*) uma das principais espécies cultivadas.

A rápida expansão e intensificação da produção de pescados têm contribuído para a instalação e a proliferação de agentes patogênicos nos diferentes estágios da cadeia produtiva. Sem o controle apropriado, estes agentes, dentre eles principalmente as bactérias, podem afetar diretamente a qualidade sensorial, segurança e a vida útil de pescados e seus derivados (KOLODZIEJSKA et al., 2002).

Além de contribuírem para a deterioração do produto final e do risco à saúde pública, estes microrganismos, em condições adequadas, desencadeiam doenças nos peixes e geram impactos econômicos negativos para a cadeia produtiva.

Neste contexto, as bactérias do gênero *Aeromonas* assumem grande importância, muitas vezes aparecendo como agente primário causador de lesões ulcerativas e septicemia hemorrágica em peixes de água doce (GHENGHESH et al., 2001; SOUZA & SILVA-SOUZA, 2001; SAHA & PAL, 2002), acarretando perdas na produção e na qualidade do pescado (VIVEKANANDHAN et al., 2002; RADU et al., 2003).

Algumas espécies de *Aeromonas* têm sido associadas a doenças em seres humanos, sendo classificadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2003) como patógenos veiculados pela água e por alimentos contaminados, de interesse emergente à saúde pública (HEUZENROEDER et al., 1999; MARTINS et al., 2002).

Assim, os frigoríficos, pesqueiros e pisciculturas podem receber peixes com uma alta carga de patógenos, especialmente bactérias, que contribuem para o aumento do risco de infecções de origem alimentar e diminuição do tempo de vida útil deste produto. Isso se deve a vários fatores, entre eles a contaminação da água de criação dos peixes.

As bactérias *A. hydrophila* por estarem presentes naturalmente na superfície dos peixes e na água de criação, em determinadas condições como estresse dos animais, causado, por exemplo, por adensamento durante o transporte ou manuseio inadequado, podem se multiplicar causando doença nos animais e, conseqüentemente, riscos a saúde pública.

Portanto, a presença de diversas bactérias patogênicas, tanto para a saúde dos peixes, quanto para a saúde humana, nos sistemas de produção sugerem a necessidade de um controle sanitário rígido desse agente.

Algumas empresas têm atuado na interface da biosegurança no momento da recepção dos peixes nos diferentes segmentos da cadeia produtiva. Porém, os produtos e insumos químicos (sanitizantes) presentes no mercado não são utilizados de forma direta nos animais. Assim, o desenvolvimento de um produto que possa ser utilizado como banho sanitizante dos peixes no momento da transferência entre os entrepostos seria fundamental para o aumento da biosegurança na aquicultura brasileira, pois contribuiria para uma diminuição da carga de microrganismos patogênicos, favorecendo a aclimatação dos peixes ao novo ambiente e, até mesmo na diminuição da contaminação no momento do abate.

O desenvolvimento de um produto para ser utilizado na aquicultura envolve muitos estudos preliminares, uma vez que, o produto será utilizado diretamente no ambiente aquático.

Primeiramente, são necessários estudos sobre a toxicidade inerente do produto para os organismos aquáticos com ensaios de toxicidade aguda. A realização de ensaios de ajuste de dose e tempo de exposição ao produto é importante para definir a dose a ser utilizada a campo e para a determinação do risco ambiental que este produto causa para os animais expostos. Uma vez determinada a faixa de concentração segura do produto para ser utilizada nos animais, ou seja, que não causa efeito de intoxicação nos organismos, é possível a realização de estudos sobre a eficácia do produto no objetivo que se deseja utilizá-lo.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- i) Determinar a toxicidade aguda (CL50;48h) e o risco ambiental do sanitizante composto por glutaraldeído + cloreto de dimetil cocobenzil amônio para tilápias (*Oreochromis niloticus*);
- ii) Verificar a eficácia do sanitizante utilizado na água de criação de tilápias na redução da população de *Aeromonas hydrophila* presentes na pele dos peixes e na água de criação, por contaminação experimental.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Cadeia produtiva de pescados e sua relação com a saúde pública

O peixe é alimento de fácil digestão, fonte de proteína de alto valor biológico e ácidos graxos polinsaturados. Os vários benefícios provenientes da ingestão da carne de peixes (PACHECO et al., 2003) aliado a mudanças na dieta dos consumidores em busca de hábitos alimentares mais saudáveis tem resultado em um rápido crescimento do consumo no mundo.

Segundo a Food and Agricultural Organization (FAO) (2009) a produção mundial de pescado em 2006 foi de 152.260.673 de toneladas, tornando esta carne uma das mais consumidas. No Brasil, em relação a outros setores da agropecuária brasileira, a aquicultura teve um incremento de 23% na produção anual entre os anos de 1990 e 2003, enquanto que, as taxas de crescimento dos setores de aves (10%), suínos (7,9%) e bovinos (4%) foram significativamente menores (ALBINATI, 2007).

A tilápia é o segundo maior grupo de peixes cultivados do mundo, em primeiro lugar está a carpa (FAO, 2010). No Brasil, a tilápia é o peixe mais criado em águas doces, principalmente, devido à suas características de rusticidade, resistência, produtividade e boas propriedades sensoriais da carne (MAREGONI, 2006). O Brasil é hoje o 6º maior produtor de tilápia criada do mundo, ou 7º, se considerarmos Taiwan separado da China, este é o maior produtor desse peixe, com cerca de 980 mil toneladas em 2005.

A rápida expansão na criação intensiva de tilápias no Brasil está associada à instalação de um grande número de empreendimentos de pequeno porte. Mas muitos desses empreendimentos negligenciam boas práticas para um manejo sanitário eficiente, contribuindo de forma significativa para a instalação e multiplicação de agentes etiológicos de enfermidades na criação.

A intensificação da produção tem contribuído com o aumento da ocorrência de contaminação microbiana nesta atividade, e, conseqüentemente, no produto final, representando preocupação para a saúde pública (ROTH & ROSENTHAL, 2006).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), doença de origem alimentar pode ser definida como aquela de natureza infecciosa ou tóxica, causada por agentes que entram no organismo pela ingestão de alimento contaminado (WHO, 2003).

As doenças de origem alimentar são, em sua maioria, causadas pela contaminação microbiana, o que pode ocorrer em qualquer etapa da cadeia produtiva, pela ausência de procedimentos adequados nas etapas de produção, transporte, comercialização e consumo de alimentos. As doenças de transmissão alimentar (DTA), de modo geral, são identificadas por sintomas gastrintestinais, principalmente diarreia, vômito e dores abdominais. Dentre os vários organismos que podem causar diarreia, as bactérias são importantes e de maior ocorrência, sendo as únicas que são limitadas pela legislação para alimentos (ANVISA, 2001).

Em geral o aumento da incidência das DTA resulta em impacto sócio-econômico para a população em decorrência de sua importância para a saúde pública, e prejudica as negociações internacionais de alimentos (HANASHIRO, 2002).

Apesar dos poucos relatos de doenças de origem alimentar no Brasil, a comunidade científica tem relatado casos de intoxicações veiculadas por pescados (GERMANO et al., 1993).

O produto brasileiro que abastece o mercado nacional geralmente é de baixa qualidade, com elevada carga microbiana, e isto se deve a falta de medidas que priorizem a qualidade por parte dos pescadores e empresários do comércio em questão (ALMEIDA FILHO et al, 2002).

3.2 Microrganismos patogênicos nos peixes e no ambiente aquático

A contaminação do pescado é influenciada por fatores ambientais, associados aos sistemas de produção aquícolas, condições higiênico-sanitárias durante o processamento, armazenamento, transporte e comercialização do produto final (GONZÁLES-FANDOS et al., 2004).

Quando os organismos são submetidos a estresse, como em criações intensivas, ocorre imunossupressão, desencadeando as enfermidades causadas por agentes oportunistas (MARTTY, 1986; PAVANELLI et al., 1997).

O peixe, como qualquer outro alimento, tem sua microbiota própria e podem sofrer alterações dependendo de alguns fatores externos, como a contaminação de seu habitat, seja ele estuário, fluviais, lacustre ou marinho, por meio de esgotos e cursos de água poluída. Algumas bactérias são típicas de ambientes marinhos e outras de água doce. Apesar da microbiota de ambos os tipos de peixes serem semelhantes, existem algumas bactérias de interesse para a saúde pública que figuram na legislação brasileira como *Salmonella* spp., *Staphylococcus* sp., *Vibrio* sp. e *Escherichia coli* (ANVISA, 2001).

LEITÃO et al. (1993) descreveram que o pescado tem naturalmente a microbiota própria da espécie, localizada principalmente no intestino, brânquias e limo superficial. Essa microbiota pode trazer conseqüências durante a comercialização e transformação do produto para consumo final, pois acelera o início de deterioração da carne.

No habitat natural, os peixes são contaminados por determinados patógenos como *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, dentre outros microrganismos mesófilos (FILHO et al., 2002).

Há uma grande variação na microbiota bacteriana dos peixes ao redor do mundo devido às peculiaridades geográficas e alguns gêneros são especialmente relacionados aos sistemas de aquicultura como *Aeromonas* spp., *Micrococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* spp., *Plesiomonas* sp. e membros das famílias *Moraxellaceae* e *Enterobacteriaceae* (NEDOHULA & WESTHOFF, 1997; DASKALOV, 2006).

Apesar de ser amplamente aceito que a microbiota inicial da água de criação de peixes varia de acordo com as condições e temperatura da água, vários estudos sobre água de produção de diferentes espécies de peixes relatam contagem de bactérias entre 10^2 e 10^6 UFC.g⁻¹ (CHYTIRI et al., 2004).

Pode ser encontrada grande variedade de bactérias na camada de muco que reveste a pele, brânquias e intestino dos peixes (MOLLERKE et al., 2002). BOARI et al. (2008) encontraram *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* spp. e *Enterococcus* sp. em água de cultivo, tegumento, intestino e filés de *Oreochromis niloticus* sendo que as populações microbianas variaram entre 10 e 10^3 UFC.g⁻¹ ou mL⁻¹.

Na pele a carga microbiana é de aproximadamente 10^2 a 10^4 UFC.cm²⁻¹ enquanto que nas brânquias a carga varia de 10^3 a 10^6 UFC.g⁻¹ (OGAWA & OGAWA, 1999).

3.2.1 *Aeromonas* spp

As bactérias pertencentes ao gênero *Aeromonas* estão associadas aos ambientes aquáticos e são reconhecidas como patogênicas para peixes desde 1984 (KIRKAN et al., 2003). Consistem de microrganismos oxidase e catalase positivos, anaeróbios facultativos, geralmente móveis devido à presença de flagelo polar, Gram negativos e fermentadores da glicose. Apesar da maioria das estirpes isoladas de alimentos serem mesófilas, muitas podem se multiplicar sob temperatura de refrigeração (KIROV, 1997).

HOZBOR et al. (2006), estudando mudanças na microbiota do salmão cru (*Pseudoperca semifasciata*) durante a estocagem em gelo por 20 dias e sua correlação com o índice de qualidade, relataram a presença de *Aeromonas* sp. no músculo do salmão e seu alto potencial de deterioração do pescado.

Aeromonas hydrophila, um agente etiológico de doenças de peixes, é considerado um patógeno primário e secundário ocasionando hemorragia septicêmica nos animais (LU, 1992).

Alguns estudos demonstraram populações de *Aeromonas hydrophila* presente em água de rios, variando entre 10^3 e 10^5 UFC.100 mL⁻¹ (KAPER et al., 1981; PATHAK et al., 1988). POFFÉ & BEECK (1991) encontraram populações de *A. hydrophila* entre 10^4 e 10^6 UFC.mL⁻¹ em águas que recebiam esgotos, e uma média de 10^4 UFC.mL⁻¹ em efluentes secundários. LEITÃO & SILVEIRA (1991) verificaram que a população mínima observada de *Aeromonas* spp em água de origem fluvial foi de 2,60 log UFC.mL⁻¹ e a máxima de 3,61 log UFC.mL⁻¹. No caso de *A. hydrophila*, foram verificadas contagem mínima de 2,34 log UFC.mL⁻¹ e máxima de 3,27 log UFC.mL⁻¹.

A. hydrophila, multiplica-se dentro do intestino dos peixes causando uma hemorragia mucosa descamativa (excesso de secreção mucosa), onde os metabólitos tóxicos são absorvidos pelo intestino levando à intoxicação (SOUZA, 2002).

Os seres humanos adquirem *A. hydrophila* por meio da ingestão de água ou alimentos contaminados. No Brasil, grande parte do pescado produzido é comercializada *in natura* após abate artesanal sem um processamento adequado. Em muitos casos, a frequência de inspeção sanitária nesses alimentos é baixa (ROUBACH et al., 2003). Este fato eleva o risco de veiculação de bactérias patogênicas ou comensais portadoras de genes de resistência aos seres humanos.

Os acidentes durante o abate de peixes contaminados, como ferir a mão em uma barbatana afiada, são um meio para o ser humano ser infectado por *Aeromonas* sp. (MERINO et al., 1995).

3.3 Toxicidade aguda de sanitizantes utilizados na cadeia produtiva de pescados

A ecotoxicologia é o estudo dos efeitos de uma ou mais substâncias aos organismos e como esses organismos reagem com seus hábitat (Blaise, 1984, apud ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008). Ainda segundo estes autores a toxicidade de agentes químicos no meio hídrico é avaliada por meio de ensaios ecotoxicológicos com organismos representantes dos níveis tróficos das cadeias biológicas locais. O conhecimento da toxicidade desses agentes para diferentes organismos aquáticos possibilita o estabelecimento de limites permissíveis de várias substâncias químicas para a proteção da vida aquática e avaliação do impacto momentâneo que causam à biota dos corpos hídricos

Os ensaios de ecotoxicidade fornecem informações sobre a letalidade relativa dos organismos frente a um produto, sendo delineado para determinar a concentração suficiente para causar efeito adverso a 50% dos organismos-teste (CL₅₀). Esta concentração é estimada pela exposição dos organismos-teste a várias concentrações de uma solução do produto durante um determinado período de tempo e as respostas dos organismos são observadas (GHERARDI & BERTOLETTI, 1990).

Segundo BIRGE et al. (1985) os ensaios de toxicidade aguda são aqueles que avaliam os efeitos, em geral severos e rápidos, sofridos pelos organismos expostos ao agente químico em um curto período de tempo (48 horas).

Os sanitizantes são divididos em vários grupos, como por exemplo, agentes oxidativos contendo peróxidos e halógenos ou agentes redutores contendo formaldeído, ácido, álcool e fenol. Um sanitizante ideal deve atuar rapidamente, ser seguro para manipuladores, não apresentar risco para o ambiente e ser facilmente disponível. Além disso, qualquer concentração residual não deve deixar efeito nocivo nos peixes (KIM et al., 2008).

Muitos sanitizantes químicos são usados como biocidas em aquicultura no controle de infecções bacterianas. Segundo LEUNG (2001), em exposições agudas, a média de concentração letal de glutaraldeído é 7 mg.L^{-1} . O glutaraldeído é facilmente biodegradável em água doce. O mesmo autor verificou que o glutaraldeído utilizado a 10% demonstrou efetividade contra *Edwardsiella tarda* e *Staphylococcus* spp. a 200 ppm por 60 minutos e acima de 400 ppm por 20 minutos foi efetivo também contra *Vibrio* sp e *Streptococcus* spp.

As Agências de Saúde Ocupacional dos USA e a Internacional para a investigação do câncer classificam o glutaraldeído, segundo a sua toxicidade, como um agente não mutagênico, não cancerígeno e sem toxicidade sistêmica (BALLANTYNE, 2001). Porém pode ser considerado um agente químico muito irritante e sensibilizante de pele e mucosas ocular e respiratória em condições ambientais desfavoráveis (ANVISA, 2007).

O produto testado no presente estudo é um desinfetante de alto desempenho a base de uma amônia natural (CocoQuat) + glutaraldeído, muito utilizado em programas de higiene de instalações de animais. O cocoquat é formado por diferentes tamanhos de cadeia carbônica, o que a diferencia das demais amônias naturais e amônias sintéticas. Este composto age nas membranas celulares de bactérias e fungos, permitindo a entrada do glutaraldeído que, por sua vez, reage com enzimas dos microrganismos. É indicado para utilização em programas de higiene de instalações de animais como auxiliar no controle de doenças bacterianas e virais. BRITO & BRITO (2009) confirmaram eficácia deste produto na redução da população de *Salmonella* sp na cadeia produtiva de aves.

3.4 Avaliação de risco ambiental

A avaliação de risco ambiental é uma outra ferramenta utilizada para avaliar o impacto dos compostos tóxicos, pois correlaciona a toxicidade aguda, em determinadas condições de laboratório, com a concentração ambiental estimada (CAE) da recomendação de uso no campo (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008).

Nenhum agente químico é totalmente seguro ou perigoso por si mesmo. De maneira geral, a quantidade utilizada, condições de uso e a susceptibilidade do organismo envolvido é que determinam o risco ambiental (CASTILHOS et. al, 2005).

Desta forma, o crescente número de contaminações ambientais por produtos químicos levou a elaboração de uma metodologia capaz de alocar os recursos destinados à remediação e de alcançar níveis permitidos de concentrações de produtos químicos no meio ambiente. Esta metodologia chama-se análise de risco ambiental e é composta pela avaliação e pelo gerenciamento de risco (USEPA, 1998).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia e no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal.

O produto testado neste estudo é composto por 15% de Glutaraldeído e 10% de Cloreto de dimetil cocobenzil amônio da Intervet Schering Plough Saúde Animal.

4.1 Determinação da toxicidade aguda do sanitizante para a tilápia (*Oreochromus niloticus*)

4.1.1 Aclimação, ensaios preliminares de toxicidade aguda e de sensibilidade

Para os ensaios de toxicidade aguda (CL50;48h), os exemplares de tilápia (*O. niloticus*) com peso entre 0,1 e 1,0 gramas foram previamente aclimatados em sala de bioensaio por sete dias em tanques de 250 L nas seguintes condições da água: temperatura de 25 ± 2 °C; pH entre 7,0 e 8,0; oxigênio dissolvido entre 5,0 e 6,0 mg.L⁻¹ (aeração constante); condutividade elétrica entre 170,0 e 180,0 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 horas de luz (ABNT, 2006).

Após a fase de aclimação foi realizado um ensaio de sensibilidade com cloreto de potássio (KCl) com teor de pureza de 99,9% para a avaliação da sanidade e da sensibilidade do lote de organismos teste (ABNT, 2006). A concentração letal 50% estimada de KCl para a tilápia foi de 1,31 g.L⁻¹ com limite inferior de 0,99 g.L⁻¹ e superior de 1,75 g.L⁻¹.

Em seguida, foi montado um ensaio preliminar de toxicidade aguda para se determinar o intervalo de concentração do sanitizante que causa 0 e 100% de mortalidade dos peixes. Neste ensaio foram testadas cinco concentrações do sanitizante: 0,01; 0,03; 0,05; 0,1 mL.L⁻¹, equivalente a 0,0025; 0,0075; 0,0125; 0,0250 mL de I.A.L⁻¹ e um grupo controle com uma réplica para cada concentração e três

peixes por réplica. A partir dos resultados do ensaio preliminar determinou-se o intervalo de concentração que foi utilizado para montagem do ensaio definitivo.

4.1.2 Ensaio definitivo de toxicidade aguda

A partir dos resultados obtidos nos ensaios preliminares foram realizados três ensaios definitivos para o sanitizante. As concentrações utilizadas foram 0,01; 0,02; 0,03 e 0,04 mL.L⁻¹ e um controle (testemunha), com três réplicas para cada concentração.

Em todos os ensaios foram utilizados três peixes em cada réplica, na densidade máxima de 1 g.L⁻¹ de água, com volume total de três litros. Os testes foram conduzidos por 48 horas em sistema estático, sem substituição, sifonagem de água e alimentação dos animais. A avaliação da mortalidade foi diária, com a retirada dos peixes mortos dos recipientes (ABNT, 2006).

As condições ambientais iniciais da água das unidades experimentais (aquários) foram: pH entre 7,0 e 8,0; oxigênio dissolvido entre 7,0 e 8,0 mg.L⁻¹; condutividade elétrica entre 170,0 e 180,0 μ S.cm⁻¹; dureza entre 50 a 60 mgCO₃⁻¹; alcalinidade entre 200 e 210 mgCaCO₃⁻¹; temperatura entre 25 e 26 °C e temperatura da sala de bioensaio entre 27 e 29 °C. As variáveis físicas e químicas da água (temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica) foram registradas em 0, 24 e 48 horas após a exposição dos peixes ao sanitizante.

Ao final de 48 horas de exposição após a determinação da relação linear da concentração e mortalidade foi calculada a CL50;48h para o sanitizante com o programa Trimmed Spearman Karber (HAMILTON et al.,1977) e o produto foi classificado pela toxicidade aguda de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1. Classificação de toxicidade aguda para organismos aquáticos.

CLASSE DE TOXICIDADE	CL50 ou CE50 (mg.L ⁻¹)
Extremamente tóxico	<0,1
Altamente tóxico	0,1 a 1,0
Moderadamente tóxico	>1,0 a <10
Ligeiramente tóxico	>10 a <100
Praticamente não-tóxico	>100

Adaptado de ZUCKER (1985)

4.2 Teste de ajuste de dose do sanitizante para a tilápia

Para avaliação da eficácia do sanitizante no controle de *A. hydrophila* inicialmente foram realizados testes de ajuste de concentração e tempo de exposição ao sanitizante em condição de microcosmo. Para isso, os animais foram submetidos aos extremos de concentração do sanitizante e tempo de exposição para avaliação dos sinais clínicos de intoxicação e os possíveis efeitos sobre as variáveis de qualidade de água (oxigênio, temperatura, condutividade elétrica e pH).

Para a realização deste teste dois grupos experimentais de animais foram utilizados: A) peixes com peso entre 25 e 60 gramas; e B) peixes com peso entre 150 e 200 g, intervalo este de classificação utilizado nos sistemas de produção de tilápia.

Os animais foram distribuídos de forma aleatória em caixas com capacidade de 60 L de água e quatro concentrações do sanitizante foram utilizadas: 0,01; 0,02; 0,03 e 0,09 mL.L⁻¹, com três repetições e um controle para cada grupo, sendo 5 animais por repetição para os peixes do grupo A (total 65 animais) e 3 animais por repetição para os peixes do grupo B (total 39 animais), totalizando treze caixas para cada grupo.

Após a distribuição dos peixes nas caixas foi realizada a aplicação do sanitizante. Para cada concentração determinou-se um tempo de exposição (Tabela 2).

Tabela 2. Concentrações testadas do sanitizante e respectivos tempos de exposição

Concentrações testadas (mL.L ⁻¹)	Tempos de exposição (minutos)
0,00	320
0,01	320
0,02	240
0,03	180
0,09	80

Durante o período de exposição ao produto foram avaliados os sinais clínicos de intoxicação dos peixes e monitoradas as variáveis de qualidade de água. Após o tempo de exposição o fluxo de água foi aberto a uma vazão de 3 mL.s⁻¹.

Ao final de 24 horas foi avaliada a porcentagem de sobrevivência dos peixes. Foram realizadas três aplicações do sanitizante nas mesmas condições descritas acima com intervalos de 24 horas, sem reposição dos peixes, ou seja, a quantidade inicial de peixes da próxima aplicação correspondia ao número de peixes sobreviventes da aplicação anterior. As variáveis de qualidade de água foram monitoradas diariamente durante o período experimental.

4.3 Avaliação de risco ambiental

O sanitizante foi analisado para classificação de risco ambiental (Tabela 3) segundo a metodologia recomendada pela USEPA (1998). Os valores do quociente Q foram obtidos a partir da divisão da concentração ambiental estimada (CAE), que é obtida no teste de ajuste de dose do sanitizante para a tilápia, pelo valor da CL50;48h do sanitizante, encontrada no teste de toxicidade aguda em condições de laboratório.

Tabela 3. Classificação de risco ambiental de compostos tóxicos de acordo com os valores calculados do quociente Q (USEPA, 1998).

Q (CAE/CL50)	Classes
<0,1	Sem risco
0,1 -1,0	Risco baixo
1,0 - 10,0	Risco moderado
>10,0	Risco alto

4.4 Avaliação da eficácia do sanitizante no controle de *A. hydrophila*

4.4.1 Protocolo de contaminação experimental da água do tanque de criação das tilápias e da pele dos peixes com *A. hydrophila* e montagem do experimento

Para este estudo foram utilizadas estirpes de *A. hydrophila* cedidas pelo Laboratório de Ictiopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Campus de Jaboticabal, Unesp. Essas estirpes foram isoladas da pele de peixes doentes de uma piscicultura da região e a identificação da espécie foi realizada no laboratório citado.

As culturas foram guardadas em tubos inclinados contendo ágar tripticase-soja (TSA) e estocadas a aproximadamente 4 a 5 °C e foram repicadas mensalmente durante o período do experimento.

No dia anterior ao preparo do inóculo a cultura de *A. hydrophila* foi repicada em TSA e incubada a 28 °C por 24 horas. Para o preparo do inóculo uma alçada da cultura foi transferida para quatro tubos falcon contendo 50 mL de caldo de soja triptona (TSB) e incubados a 28 °C por 24 a 36 horas. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 6000 xg por 10 minutos em centrífuga refrigerada a 7 °C e o *pelet* foi diluído em 50 mL de solução salina. Foram realizadas diluições seriadas de razão 10 a partir de uma alíquota dessa suspensão, utilizando-se como diluente solução salina.

Em seguida, fez-se o plaqueamento de cada uma das diluições em ágar vermelho de fenol amido-ampicilina e, após o período de incubação de 24 horas a 28 °C, foi realizada a contagem em placas que continham entre 25 e 250 UFC. Com esses resultados chegou-se na população aproximada da cultura original, que foi de 10^{10} UFC de *Aeromonas hydrophila*.mL⁻¹, a qual foi utilizada para contaminação da água do tanque e da pele dos peixes.

Os exemplares de tilápias (100 animais) com peso entre 50 e 150 g foram mantidos em tanque de 400 litros. Durante três dias os animais foram submetidos à captura e o nível de água do tanque reduzido a metade.

Após o período de indução ao estresse, os quatro tubos contendo culturas da bactéria *A. hydrophila* com aproximadamente 10^{10} UFC.mL⁻¹ cada foram administradas no tanque (Figura 5). O fluxo de água foi fechado e quatro sombrites (50% de sombreamento cada) foram colocados sobre o tanque para evitar a inativação das bactérias por irradiação solar.

Após 48 horas da administração da cultura de bactérias no tanque, a coloração da água tornou-se mais turva. Porém, não foram observados sinais clínicos externos característicos de doença por *Aeromonas* spp nos peixes, que conforme HOSHINA (1962) e CARRASCHI et al. (2011) correspondem a hemorragias ao longo da superfície do corpo e nas nadadeiras, exoftalmia, lesões cutâneas bilaterais avermelhadas com erosão da pele e corrosão da nadadeira caudal. Segundo POPMA & MASSER (1999), as tilápias são mais resistentes a baixa qualidade de água do que outras espécies de peixes de água doce.

Após este período, foram coletadas duas amostras (água e pele de peixe) e submetidas a análise microbiológica para identificação e contagem de bactéria *A. hydrophila* obtendo-se, aproximadamente, 10^5 e 10^4 UFC.mL⁻¹ respectivamente para amostras de água e pele.

Três dias (72 horas) após o procedimento de contaminação da água e da pele dos peixes em tanque de 400 L obtendo-se uma concentração de bactérias de aproximadamente 10^5 UFC.mL⁻¹ (água) e 10^4 UFC.mL⁻¹ (pele do peixe), 96 animais foram transferidos para 12 unidades experimentais (8 animais por unidade) com

capacidade de 60 L contendo a água contaminada proveniente do tanque de contaminação. Imediatamente após a distribuição da água e dos peixes contaminados foi realizada administração de três concentrações do sanitizante (0,01; 0,02; 0,03 mL.L⁻¹ e controle) com três repetições.

As coletas foram realizadas nos seguintes tempos de exposição ao produto: zero; 20; 40 e 60 minutos após aplicação. Ao final de cada tempo dois exemplares de tilápias e uma amostra de água foram coletados de cada unidade e imediatamente submetidos às análises microbiológicas, totalizando ao final do experimento 48 amostras de água e 96 amostras de pele de peixe.

4.4.3 Análise microbiológica da pele dos peixes

Na realização das análises microbiológicas foi utilizada a técnica de enxaguadura (APHA, 2001) e, para tal, foram adicionados 200 mL de água peptonada a 0,1% nos sacos plásticos estéreis, contendo os peixes. Em seguida os peixes foram massageados durante um minuto para transferir os microrganismos da pele para a água de enxaguadura. As determinações microbiológicas foram realizadas a partir desta água.

Foram preparadas diluições das amostras tomando-se, assepticamente, 25 mL de cada uma e transferindo para frascos contendo 225 mL de água peptonada a 0,1% (diluição 10⁻¹). A partir desta diluição foram preparadas diluições decimais sucessivas até 10⁻⁵, empregando-se o mesmo diluente.

Para a realização da contagem do gênero *Aeromonas* foram utilizadas placas de Petri contendo ágar vermelho de fenol-amido-ampicilina (PALUMBO et al., 1985), adicionado de ampicilina na concentração de 10 mg.L⁻¹. A semeadura foi realizada em superfície, em volumes de 0,1 mL de cada diluição. Para uma distribuição homogênea do inóculo na superfície do meio, foi utilizado um bastão de vidro em forma de “L”.

As placas foram incubadas a 28 °C por 24 horas, a seguir foram realizadas as contagens das colônias com características do gênero *Aeromonas*, que são colônias amareladas, circundadas por halo transparente formado em função da hidrólise do amido.

Para a confirmação do gênero foram isoladas até cinco colônias com as características descritas, as quais foram semeadas em tubos com ágar tripticase-soja (TSA) inclinado e incubadas a 28 °C por 24 horas.

Após o período de incubação foram realizados esfregaços corados pelo método de Gram e as culturas que se apresentaram na forma de bastonetes retos e curtos, aos pares, isolados ou em cadeias curtas e Gram negativas, foram repicadas em ágar tríplice-açúcar-ferro (TSI) (SAAD et al., 1995).

Após incubação a 28 °C por 24 horas, as culturas que apresentaram reação ácida tanto na base como no bisel, com ou sem formação de gás, foram novamente repicadas em ágar tripticase soja e, em seguida, submetidas às provas da motilidade, oxidase, catalase, seguindo esquema de caracterização adotado por HUDSON & LACY (1991). Essas provas foram realizadas conforme metodologia descrita em Mac FADDIN (1976)

Prova da motilidade- Para tal, as culturas foram inoculadas, por picada profunda, em tubos contendo ágar semi-sólido para teste de motilidade. Esses foram incubados a 28°C por 24 horas e foram consideradas móveis as culturas que apresentaram crescimento em toda a extensão do tubo.

Prova da oxidase- Para a realização desta prova, foram realizados esfregaços das culturas, com a utilização de alça de platina, em fitas para determinação de oxidase, adquiridas prontas para uso. Foram consideradas positivas as culturas cujos esfregaços adquiriram coloração rósea por alguns segundos.

Prova da catalase- Com auxílio de alça de níquel-cromo, foram realizados esfregaços das culturas em estudo na superfície de lâminas de vidro. Em seguida foi adicionada uma gota de água oxigenada a 3% e o imediato desprendimento de gás indicou teste positivo.

Os cultivos que apresentaram as características de motilidade e oxidase e catalase positivas, foram considerados como de *Aeromonas* sp.

O resultado da contagem de *Aeromonas* sp por mL da solução de enxaguadura foi obtido tendo como base o número de cultivos característicos, proporcionalmente ao número de unidades formadoras de colônias contado nas placas.

Para caracterizar a espécie *A. hydrophila* foram analisadas pelo menos 20% das culturas originárias da pele e da água, as quais foram submetidas às seguintes provas:

produção do indol, hidrólise da esculina, descarboxilação da ornitina e produção de acetoína a partir da glicose (ABEYTA JUNIOR et al., 1990).

4.4.4 Análise microbiológicas da água

Foi realizada análise microbiológica da água do tanque inicial, onde todos os peixes estavam depositados e dos mesocosmos durante o experimento. Foram colhidos 200 mL de água para cada amostra e estas foram submetidas à mesma determinação microbiológica descrita anteriormente para as amostras de pele utilizando-se diluições decimais sucessivas de até 10^{-6} .

4.5. Análises estatísticas

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial (4x4) sendo quatro tratamentos (concentração) e quatro tempos de exposição. Os dados obtidos da análise microbiológica foram submetidos à distribuição normal e após a verificação da não distribuição normal estes foram convertidos a Logx. A seguir, foi realizada a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% (ZAR, 1999).

Para se determinar os fatores de influência (concentração testada x tempo de exposição x concentração de bactéria) foi utilizada análise multivariada pelo método de análise de correspondência (AC) a partir de um espaço perceptual comum (mapas perceptuais ou intuitivos) (HAIR et al., 2005). Ela representa graficamente no mapa perceptual todos os fatores e suas respectivas categorias. A interrelação criada permite análises de similaridades entre todos os fatores e estas medidas são representadas, no gráfico, pelas distâncias entre os fatores.

5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Toxicidade aguda do sanitizante para a tilápia

A toxicidade aguda (CL50;48h) do sanitizante a base de glutaraldeído e amônia quaternária para a tilápia foi de 0,02 mL.L⁻¹ equivalente a 0,005 mL de I.A.L⁻¹ e este foi classificado como extremamente tóxico para tilápia (*O. niloticus*).

Vários estudos determinaram a toxicidade aguda do glutaraldeído. para diferentes espécies aquáticas: 12 mg.L⁻¹ para *Salmo gairdneri* (UCC, 1978), 5 mg.L⁻¹ para *Daphnia magna* (UCC, 1981), 3 mg.L⁻¹ para *Oncorhynchus kisutch* (SFU, 1993) e também da amônia quaternária (FREIERI, 1954, *apud* COOPER, 1988). Porém não foram encontrados estudos para a tilápia (*O. niloticus*).

REIFF et al. (1979) verificou a média dos valores de CL50;48h do glutaraldeído para quatro espécies de peixes entre 2,06 e 3,51 mg.L⁻¹. LEUNG et al., (2001) classificou o glutaraldeído como tóxico para organismos aquáticos com média de 7,7 mg.L⁻¹ de CL50;48h para oito espécies de peixes de água doce.

A comparação entre as observações destes autores e os resultados do presente estudo sugere que a utilização de glutaraldeído e de amônia quaternária na forma de mistura pode potencializar o efeito tóxico final.

A relação concentração-resposta (mortalidade) do sanitizante testado foi linear (Figura 1). Os organismos apresentaram os seguintes sinais clínicos de intoxicação: aumento do batimento opercular, organismos concentrados no fundo do aquário e natação errática. Após 6 horas de exposição à concentração 0,04 mL.L⁻¹ ocorreu 100% de mortalidade dos peixes nas três repetições do ensaio. Após 24 horas de exposição a 0,03 mL.L⁻¹ do sanitizante ocorreu mortalidade de 100% dos peixes. A mortalidade dos peixes expostos a 0,02 mL.L⁻¹ (44,44%) ocorreu após 24 horas de exposição e tanto esta concentração como 0,01 mL.L⁻¹ não foi observado sinais clínicos aparentes de intoxicação.

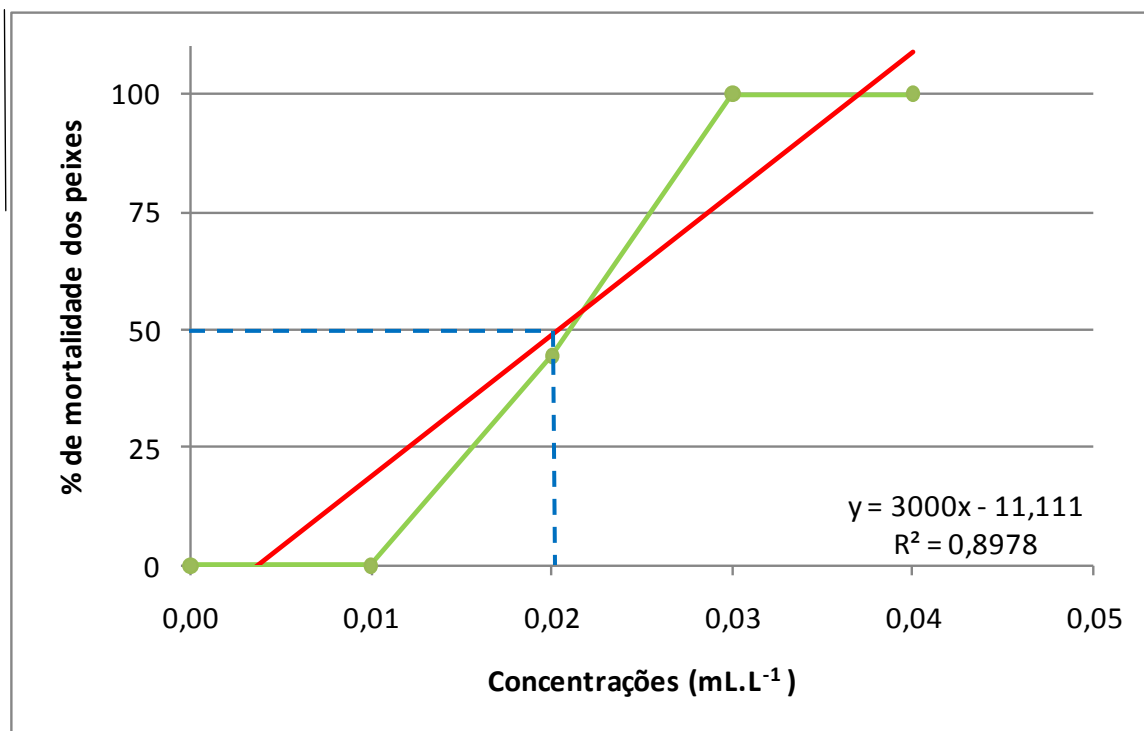


Figura 1. Relação da concentração-resposta do sanitizante para a tilápia.

5.2 Teste de ajuste de dose do sanitizante para a tilápia

No teste de ajuste de dose, 24 horas após a primeira aplicação, os peixes do grupo A (25 a 60 g) apresentaram 100% de sobrevivência na concentração 0,01 mL.L⁻¹; 87% em 0,02 mL.L⁻¹; 22% em 0,03 mL.L⁻¹; e 0% para 0,09 mL.L⁻¹.

Após a segunda aplicação (48 horas), a sobrevivência foi de 87% na concentração 0,01 mL.L⁻¹; 67% na concentração 0,02 mL.L⁻¹; e 100% na concentração 0,03 mL.L⁻¹. Após a terceira aplicação (72 horas) foi de 92% na concentração 0,1 mL.L⁻¹; 67% na concentração 0,02 mL.L⁻¹; e zero% na concentração 0,03 mL.L⁻¹ (Tabela 4).

Tabela 4. Porcentagem de sobrevivência de peixes com peso entre 25 e 60g (grupo A) durante três aplicações do sanitizante com intervalos de 24 horas.

Concentração (mL.L ⁻¹)	% sobrevivência dos peixes com peso entre 25 e 60g (grupo A)			
	% INICIAL	1ª APLICAÇÃO	2ª APLICAÇÃO	3ª APLICAÇÃO
0,00	100	100	100	100
0,01	100	100	87	92
0,02	100	87	67	67
0,03	100	22	100	0
0,09	100	0	0	0

Para este grupo, nas três aplicações, durante o período de exposição ao produto não foram observados sinais clínicos de intoxicação dos animais na concentração 0,01 mL.L⁻¹. Entretanto, na última hora de exposição ao produto (5 a 6 horas após aplicação) observou-se que os animais expostos a 0,01mL.L⁻¹ subiam à superfície em busca de oxigênio e neste período também ocorreu a mortalidade. No grupo controle foram feitas observações de forma similar.

Após abertura do fluxo de água (oxigenação da água) os sobreviventes não apresentaram sinais clínicos de intoxicação. Assim, a concentração de 0,01 mL.L⁻¹ foi considerada segura quando realizada apenas uma aplicação, independente do tempo de exposição, desde que seja realizada uma suplementação complementar de oxigênio na água ou na utilização de três aplicações com exposição inferior a três horas ao sanitizante.

Nos animais expostos a concentração de 0,02 mL.L⁻¹ do sanitizante também não foi observado sinais clínicos de intoxicação. Porém a porcentagem de sobrevivência foi menor se comparado aos expostos a 0,01 mL.L⁻¹ (Tabela 4). Neste tratamento também ocorreu permanência na superfície da água para captar oxigênio durante a última hora de exposição ao sanitizante (entre 3 e 4 horas após aplicação) e a mortalidade ocorreu após 6 horas da aplicação do produto.

Na comparação entre a concentração de $0,02 \text{ mL.L}^{-1}$ do sanitizante e o grupo controle, a concentração de $0,02 \text{ mL.L}^{-1}$ foi considerada segura quando realizada somente uma aplicação por no máximo 2 horas de exposição.

Na concentração de $0,03 \text{ mL.L}^{-1}$, após 60 minutos de exposição, os animais permaneceram na superfície da água com batimento opercular acelerado. A mortalidade (78%) foi observada após 240 minutos da aplicação do produto. Após o período de exposição e abertura do fluxo de água os animais sobreviventes não apresentaram mais sinais de intoxicação.

A ausência de efeitos sistêmicos após o término do período de exposição pode ser atribuída, em partes ao curto período de biodisponibilidade do componente glutaraldeído no organismo, devido a sua alta reatividade no sítio de exposição e seu rápido metabolismo (MCKELVEY, et al., 1992; BEAUCHAMP et al., 1992). Segundo LEUNG (2001) a toxicidade do glutaraldeído para organismos aquáticos não aumentou substancialmente com repetidas exposições de longa duração e sua tendência acumulativa é baixa, devido a sua alta solubilidade em água e baixo coeficiente de partição octanol/água. Esta concentração foi considerada segura quando realizada apenas uma aplicação do sanitizante por no máximo uma hora de exposição.

Na concentração de $0,09 \text{ mL.L}^{-1}$ do sanitizante, após 30 minutos de exposição, os animais permaneceram superfície da água com batimento opercular acelerado e alguns animais apresentaram perda na capacidade de arfagem (equilíbrio). Nesta concentração ocorreram 100% de mortalidade dos animais uma hora após a aplicação do sanitizante. Assim, esta concentração não foi considerada segura para ser utilizada como sanitizante.

Para os peixes do grupo B (150 a 200 g), 24 horas após a primeira aplicação, a sobrevivência foi de 78% para os peixes do grupo controle, 100% para a concentração de $0,01 \text{ mL.L}^{-1}$; 89% para a concentração de $0,02 \text{ mL.L}^{-1}$; de 66% para concentração de $0,03 \text{ mL.L}^{-1}$ e 0% para concentração de $0,09 \text{ mL.L}^{-1}$. Em 48 horas a sobrevivência foi de 71% para o grupo controle; 78% para a concentração de $0,01 \text{ mL.L}^{-1}$; 100% para a concentração de $0,02 \text{ mL.L}^{-1}$ e 0% para a concentração de $0,03 \text{ mL.L}^{-1}$. Após 72 horas

a sobrevivência foi de 100% para o grupo controle; 57% para a concentração de 0,01 mL.L⁻¹ e 88% para a concentração de 0,02 mL.L⁻¹ (Tabela 5).

Tabela 5. Porcentagem de sobrevivência de peixes com peso entre 150 e 200g (grupo B) durante três aplicações do sanitizante com intervalos de 24 horas.

Concentração (mL.L ⁻¹)	% sobrevivência dos peixes com peso entre 150 e 200 g (grupo B)			
	INICIAL	1ª APLICAÇÃO	2ª APLICAÇÃO	3ª APLICAÇÃO
0,00	100	78	71	100
0,01	100	100	78	57
0,02	100	89	100	88
0,03	100	66	0	0
0,09	100	0	0	0

Para todas as concentrações, nas três aplicações, verificou-se que após 120 minutos de exposição ao produto a maioria dos animais permaneceu na superfície da água para captar oxigênio. Este comportamento também ocorreu no grupo controle.

Nas aplicações de 0,01 e 0,02 mL.L⁻¹ do sanitizante não ocorreu sinais clínicos de intoxicação. Nas três aplicações, a mortalidade dos animais expostos a estas concentrações ocorreu após o período de exposição ao produto (24 horas após aplicação).

Na concentração de 0,03 mL.L⁻¹, 60 minutos após a primeira aplicação do produto, os animais não apresentaram sinais de intoxicação. Após este período, foi observado aumento no batimento opercular e perda da capacidade de arfagem em alguns animais. Após a abertura do fluxo de água (três horas após aplicação) alguns animais buscavam oxigênio na superfície próximo à vazão de água, porém o oxigênio dissolvido na água permaneceu sem alteração em 5,0 mg.L⁻¹. A mortalidade dos animais ocorreu após seis horas da aplicação.

Assim, a concentração de 0,03 mL.L⁻¹ foi considerada segura para a realização de uma aplicação por no máximo uma hora de exposição.

Apesar de alguns estudos relatarem que tanto em animais quanto em humanos, os sinais de intoxicação por glutaraldeído (principal ingrediente ativo do sanitizante testado neste estudo) se limitam ao local de exposição (BALLANTYNE & BERMAN, 1984; NEEPER-BRADLEY & BALLANTYNE, 2000; BALLANTYNE & MYERS, 2001), NICNAS (1994) verificou irritação respiratória em 50% dos ratos expostos a uma concentração $13,8 \text{ mg.kg}^{-1}$ de glutaraldeído. No presente estudo não foi observado irritação na pele dos animais expostos às quatro concentrações do produto testadas.

Na concentração de $0,09 \text{ mL.L}^{-1}$, após 30 minutos de exposição os animais apresentaram sinais claros de intoxicação: permanência de alguns animais parados no fundo das caixas com batimento opercular acelerado e com perda da capacidade de arfagem, outros permaneceram na superfície da água na tentativa de captar oxigênio na interface água-ar, mesmo com o oxigênio dissolvido na água em torno de $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$. Uma hora após a primeira aplicação do produto ocorreu mortalidade de 100% dos animais. Portanto, esta concentração não foi considerada segura para ser utilizada.

5.3 Risco ambiental do sanitizante para a tilápia

O produto foi classificado como de baixo risco de intoxicação ambiental para a tilápia nas concentrações $0,01 \text{ mL.L}^{-1}$ e $0,02 \text{ mL.L}^{-1}$. Este mesmo produto utilizado na concentração $0,03 \text{ mL.L}^{-1}$ foi classificado como risco moderado de intoxicação para a tilápia.

O risco ambiental do sanitizante foi $Q = 1,0$ sendo classificado como baixo risco de intoxicação ambiental para a tilápia (*O niloticus*). Este cálculo foi obtido pela razão entre a concentração ambiental estimada (CAE: $0,02 \text{ mL.L}^{-1}$) e o valor da $CL_{50;48h}$ ($0,02 \text{ mL.L}^{-1}$) de acordo com a metodologia recomendada da USEPA (1998).

5.4. Avaliação da eficácia do sanitizante no controle de *A. hydrophila*

5.4.1 Análise microbiológica da água

Para a presença de *A. hydrophila* na água de criação de tilápia, ocorreu interação significativa ($p < 0,05$) entre as concentrações do sanitizante testadas. Em $0,01$

mL.L⁻¹ do sanitizante ocorreu redução de 0,33 log UFC.mL⁻¹ de *A. hydrophila* na água de criação de tilápias; em 0,02 mL.L⁻¹ a redução foi de 0,19 log UFC.mL⁻¹ e em 0,03 mL.L⁻¹, foi de 0,4 log UFC.mL⁻¹ em relação ao grupo controle.

A média de UFC.mL⁻¹ na concentração de 0,03 mL.L⁻¹ diferiu significativamente da média do grupo controle, mas não diferiu das demais concentrações (Figura 2). Assim, se for considerado apenas as concentrações do sanitizante, independente dos tempos de exposição, a concentração de 0,03 mL.L⁻¹ do sanitizante é suficiente para obter redução de bactérias na água de peixes.

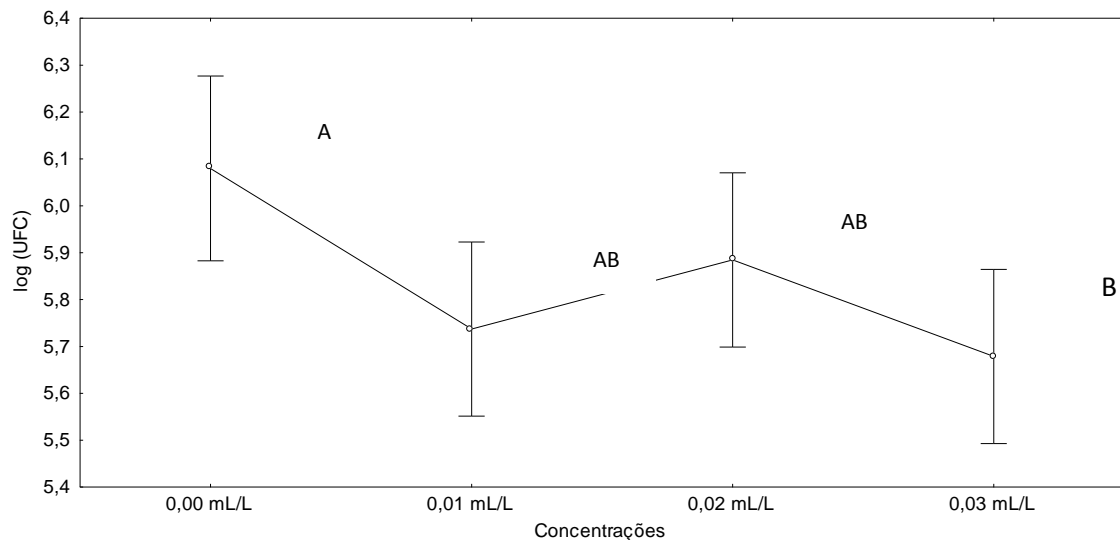


Figura 2. Relação das concentrações aplicadas do sanitizante e a população de *A. hydrophila* em amostras de água. Médias acompanhadas de letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$).

Em relação aos tempos de exposições do sanitizante, ocorreu interação significativa ($p < 0,05$), ou seja, o tempo interferiu na redução da população de bactérias.

O tempo 60 minutos diferiu significativamente do tempo 0, mas não se diferiu dos tempos 20 e 40 minutos (Figura 3).

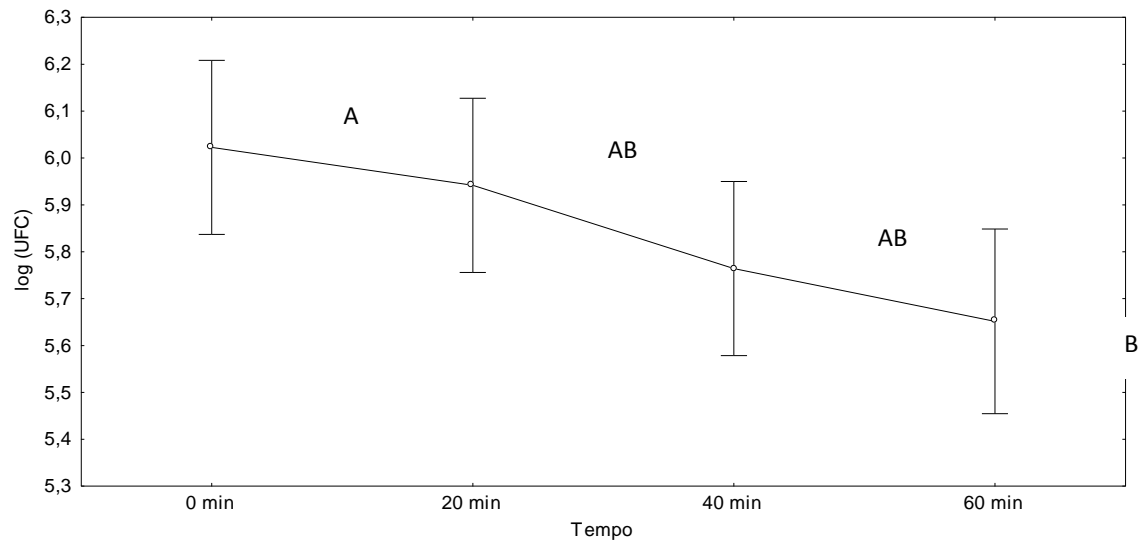


Figura 3. Relação dos tempos de exposição do sanitizante e a redução da população de *A. hydrophila* em amostras de água. Médias acompanhadas de letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$).

Assim, o tempo mínimo de exposição do produto para que ocorra redução da população de bactérias, sem considerar a interação com as concentrações, é de 60 minutos.

A interação entre as concentrações e os tempos de exposição não foi significativa pelo teste de Tukey ($p > 0,05$) (Tabela 6). Ainda assim, os resultados observados quando utilizado o tempo 60 minutos de exposição foram mais satisfatórios do que os resultados apresentados por BERNARDES et al. (2003) que verificou uma redução de 0,4 log UFC de *A. hydrophila* por mL de água de criação de peixes com a utilização do sanitizante biguanida polimérica na desinfecção dos tanques durante o vazio sanitário. Estes mesmos autores não verificaram redução na contagem da população de *A. hydrophila* presente na água de criação dos peixes quando utilizado óxido de cálcio na proporção de 100 g.m² ou formaldeído a 5%.

Tabela 6. População de *A. hydrophila* (Log_{10} UFC) no decorrer do tempo para as concentrações do sanitizante a partir de análises microbiológicas da água de criação dos peixes.

Concentração (mL.L^{-1})	Contagem de UFC de <i>A. hydrophila</i> no decorrer do tempo (minutos)			
	0	20	40	60
0,00	6,14 Aa	6,08 Aa	5,86 Aa	6,23 Aa
0,01	5,72 Aa	5,83 Aa	5,83 Aa	5,57 Aa
0,02	6,03 Aa	5,92 Aa	5,91 Aa	5,68 Aa
0,03	6,20 Aa	5,93 Aa	5,46 Aa	5,12 Bb

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ($p < 0,05$).

No mapa perceptual da análise multivariada das amostras de água (Figura 4) foi possível relacionar os fatores concentração e tempo de exposição e verificar a correspondência entre eles. Quanto mais próximos os fatores, mais correspondentes eles são. Assim, o círculo vermelho representa a forte correspondência entre o tempo 40 minutos e a concentração $0,03 \text{ mL.L}^{-1}$. A seta vermelha indica a correspondência desses fatores à baixa concentração de UFC da bactéria *A. hydrophila* (em azul na figura).

Da mesma forma, a baixa concentração de UFC de *A. hydrophila* também está correspondente ao tempo 60 minutos e à concentração de $0,02 \text{ mL.L}^{-1}$ do sanitizante.

Por outro lado, observa-se a correspondência entre a alta concentração de *A. hydrophila* (em vermelho) com o grupo controle e com o tempo zero de exposição, concordante com os resultados obtidos a partir das análises univariadas.

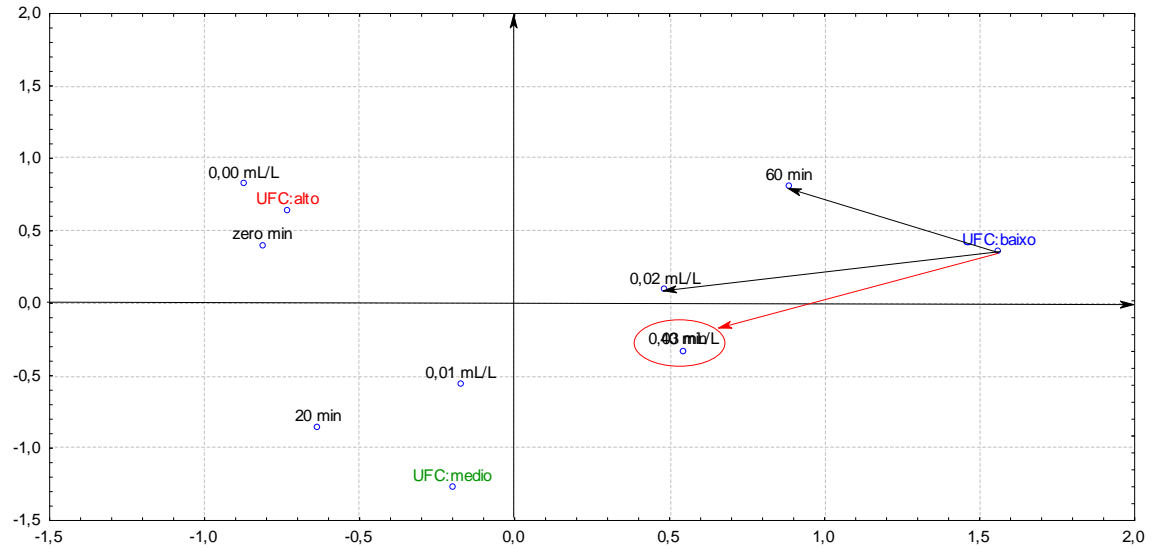


Figura 4. Mapa percentual das concentrações do sanitizante Omnicide® e tempos de exposição em amostras de água de tilápia (*O. niloticus*) contaminada artificialmente com *A. hydrophila*.

5.4.2 Análise microbiológica da pele

Para a análise realizada na pele dos animais ocorreu interação significativa ($p < 0,05$) entre as concentrações testadas e o número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *A. hydrophila*.

O número de UFC da bactéria na concentração de $0,01 \text{ mL.L}^{-1}$ do sanitizante não diferiu do grupo controle. As concentrações de $0,02$ e $0,03 \text{ mL.L}^{-1}$ diferiram da concentração de $0,01 \text{ mL.L}^{-1}$ e do grupo controle, mas não diferiram entre si (Figura 5), sendo que a concentração de $0,02 \text{ mL.L}^{-1}$ reduziu a contagem para $1,24 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$ e a concentração de $0,03 \text{ mL.L}^{-1}$ reduziu a contagem para $1,42 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$. Assim, $0,02$ e $0,03 \text{ mL.L}^{-1}$ do sanitizante tem o mesmo efeito na redução da população de *A. hydrophila* na pele das tilápias.

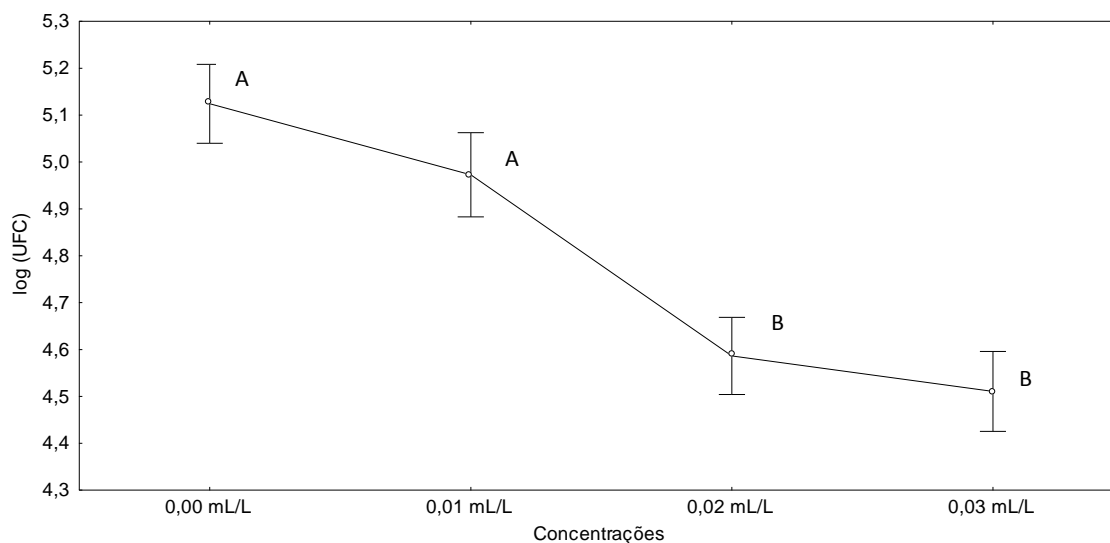


Figura 5. Relação das concentrações aplicadas do sanitizante e a população de *A. hydrophila* em amostras de pele de peixe. Médias acompanhadas de letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$).

Em relação aos tempos de exposição, a interação foi significativa ($p < 0,05$). Verificou-se no decorrer do tempo testado a ação contínua do sanitizante (Figura 6).

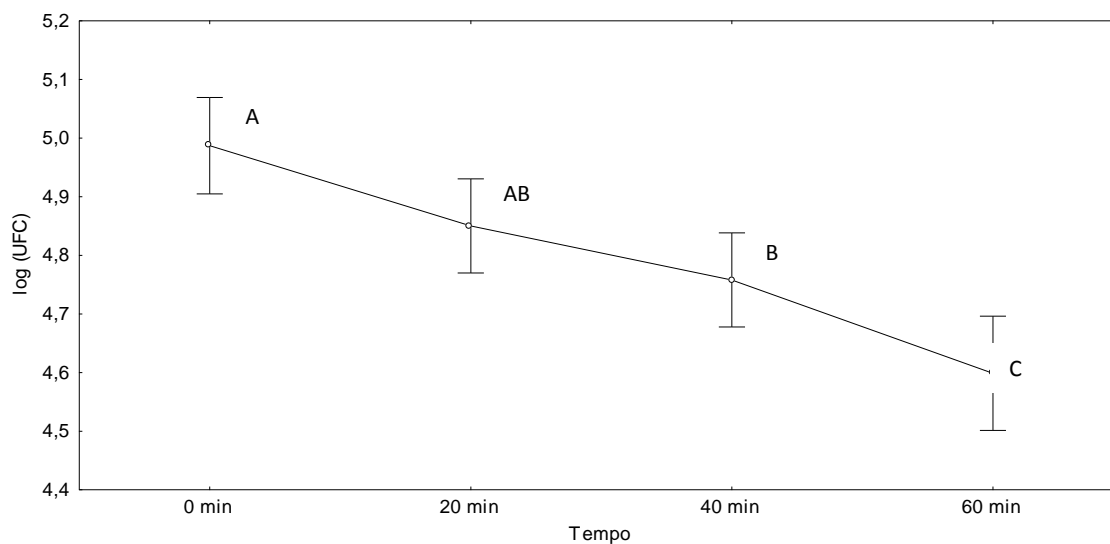


Figura 6. Relação dos tempos de exposição do sanitizante e a população de *A. hydrophila* em amostras de pele de peixe. Médias no gráfico acompanhadas de letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$).

Em 20 minutos de exposição ocorreu redução de 0,32 logUFC.mL⁻¹ de *A. hydrophila* e esta redução não foi considerada significativa em relação ao tempo zero. Conforme algumas referências da literatura, a solução de glutaraldeído a 2% (principal composto do sanitizante testado no presente estudo) utilizada como desinfetante de materiais requer 20 minutos de exposição para efetivar o alto nível de desinfecção (WHO, 2004 *apud* ANVISA, 2007; MARTINDALE, 2007 *apud* ANVISA, 2007).

O tempo 60 minutos foi considerado superior na redução de *A. hydrophila* em amostras de pele em relação aos demais tempos (redução de 0,91 logUFC.mL⁻¹). O tempo 40 diferiu do tempo 0 ($p < 0,05$) e reduziu de 0,53 logUFC.mL⁻¹ de *A. hydrophila*.

Assim, verificou-se que o tempo mínimo de exposição do sanitizante necessário para ocorrer redução significativa da população de bactérias, independente da concentração utilizada, foi de 40 minutos.

A interação entre as concentrações do sanitizante e os tempos de exposição foi significativa ($p < 0,05$) (Tabela 7).

Tabela 7. População de *A. hydrophila* (Log UFC) no decorrer do tempo para as concentrações do sanitizante a partir de análises microbiológicas da pele dos peixes.

Concentração do (mg.L ⁻¹)	Log ₁₀ (UFC) de <i>A. hydrophila</i> no decorrer do tempo (minutos)			
	0	20	40	60
0,00	5,03 Aa	5,06 Aa	5,11 Aa	5,28 Aa
0,01	4,92 Aa	4,95 Aa	5,01 Aa	4,98 Aa
0,02	4,97 Aa	4,72 ABa	4,53 BCb	3,98 Cb
0,03	4,98 Aa	4,68 ABa	4,36 BCb	3,89 BCb

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ($p < 0,05$).

Na figura 7 verifica-se que a população de bactérias do grupo controle manteve-se constante até 40 minutos de exposição e após este período começou a aumentar. Talvez, este comportamento de aumento da população de bactérias possa estar associado ao estresse dos animais causado durante o período do experimento de eficácia do produto e à adaptação da bactéria ao ambiente.

A alta densidade dos animais nas unidades experimentais e o manejo realizado durante o experimento podem ter contribuído para causar o estresse e

consequentemente, a diminuição da imunidade do animal. Segundo PAVANELLI, et al. (1997) nessas condições, *Aeromonas spp.* apresentam uma capacidade patogênica importante. Assim, por ser uma bactéria oportunista e estar presente em concentrações relativamente altas durante o experimento, *A. hydrophila* pode ter se multiplicado.

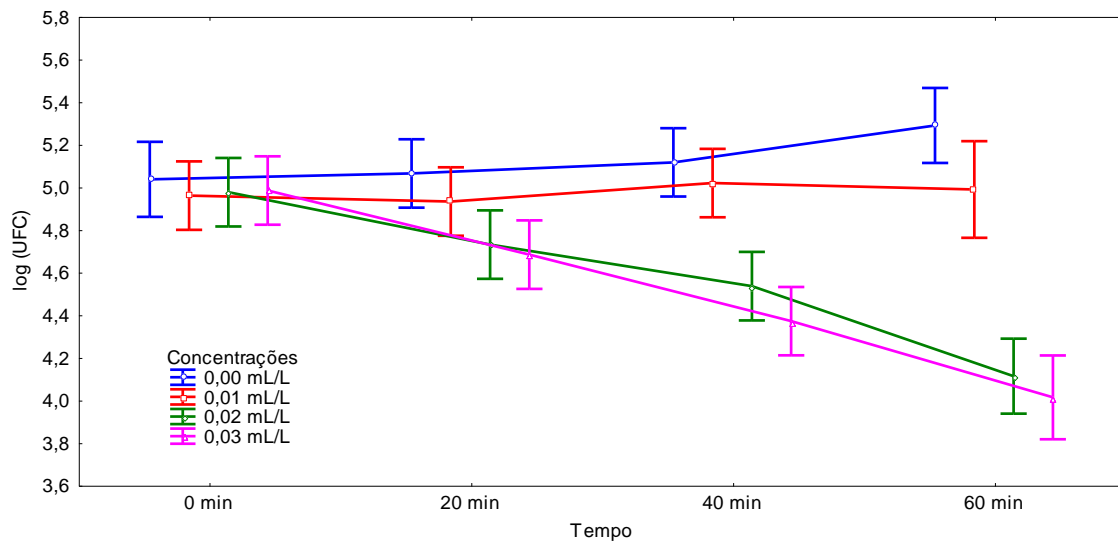


Figura 7. Relação das concentrações do sanitizante no decorrer dos tempos de exposição e a população de *A. hydrophila* em amostras de pele.

Na concentração de 0,01 mL.L⁻¹ do sanitizante, não ocorreu diferença significativa entre os tempos ($p > 0,05$), ou seja, o número de bactérias não reduziu no decorrer do tempo.

Na concentração de 0,02 mL.L⁻¹ ocorreu diferença significativa entre os tempos ($p < 0,05$). Os tempos 40 e 60 minutos não diferiram entre si e diferiram dos demais tempos ($p < 0,05$). Assim, a exposição na concentração de 0,02 mL.L⁻¹ por 60 minutos foi superior na redução da contagem de *A. hydrophila* (redução de 1,3 log UFC.mL⁻¹), porém, a exposição por 40 minutos também reduziu significativamente (0,58 log UFC.mL⁻¹) a população de bactérias *A. hydrophila* em relação ao grupo controle.

Para a concentração de 0,03 mL.L⁻¹ ocorreu diferença significativa entre os tempos ($p < 0,05$). Os tempos 40 e 60 minutos diferiram dos demais tempos e não

diferiram entre si. Em 40 minutos de exposição, a redução foi de 0,75 log UFC.mL⁻¹ em relação ao grupo controle e em 60 minutos foi de 1,39 log UFC.mL⁻¹.

Apesar de alguns estudos relatarem resistência de bactérias Gram-negativas a produtos químicos, principalmente, aos compostos de amônias quaternárias (HEINZEL, 1988; RUSSELL et al. 1986), a utilização do sanitizante nas concentrações 0,02 e 0,03 mL.L⁻¹ durante 60 minutos reduziu até quase 1,5 log UFC.mL⁻¹.

A redução da população de *A. hydrophila* observada no presente estudo é similar ao estudo realizado por SUNDHEIM, et al. (1998), qual verificou redução de 1,5 a 2,0 log UFC de bactérias *Pseudomonas* spp em água utilizando 40 mg.L⁻¹ amônia quaternária por 5 minutos em condições de laboratório.

O mapa perceptual (figura 8) mostrou correspondências que são concordantes com a análise univariada. Observa-se forte associação entre altas concentrações de *A. hydrophila* (em vermelho) e o grupo controle e também com o tempo zero de ação do produto.

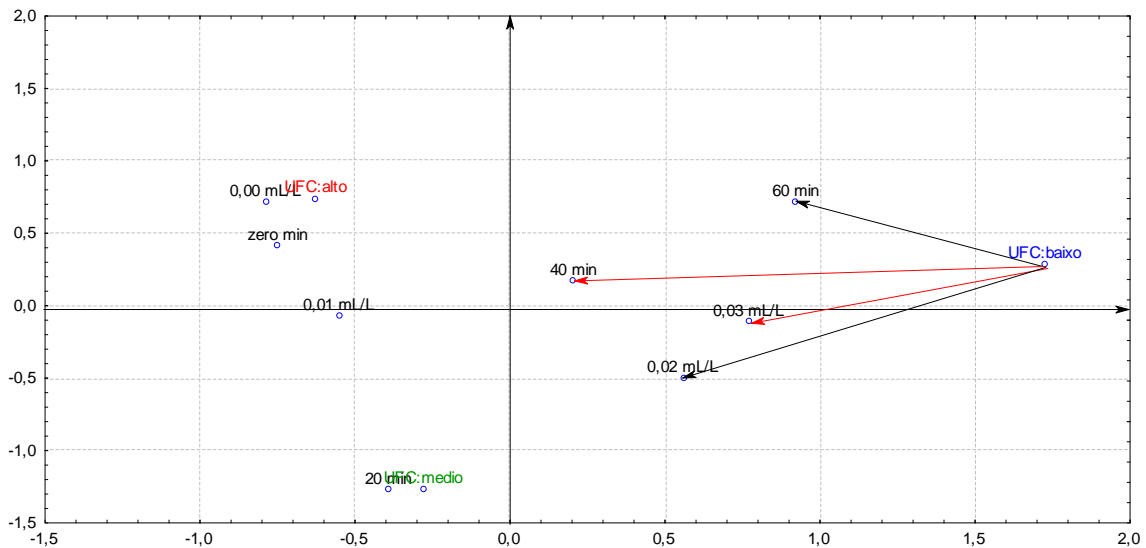


Figura 8. Mapa perceptual das concentrações do sanitizante, tempos de exposição e concentrações da população de bactérias em amostras de pele de tilápia (*O. niloticus*) contaminada artificialmente com *A. hydrophila*.

Na seqüência, médias concentrações de *A. hydrophila* representadas na figura por “UFC médio” (em verde) correlacionam-se fortemente com o tempo 20 minutos de exposição ao produto.

Já os valores baixos da concentração da bactéria, representados por “UFC baixo” (em azul), não possuem fortes correspondências, mas podem ser associados às concentrações 0,02 mL.L⁻¹, 0,03 mL.L⁻¹ e ao tempo 60 minutos de exposição.

No presente estudo, observa-se, portanto, que os tempos e as concentrações interferem positivamente na redução da população de bactérias *A. hydrophila*. Assim, com a utilização da maior concentração do sanitizante com o maior tempo de exposição ocorreu maior redução na população de bactérias.

A partir observação das associações entre estes fatores no mapa perceptual e da comparação entre as reduções da população de bactérias com a utilização de diferentes concentrações do sanitizante testado no decorrer do tempo de exposição, observa-se que não é interessante alterar o tempo de exposição avaliado. Neste caso, a melhor opção seria diminuir a concentração do produto e utilizar o tempo 60 minutos.

5.5 Confirmação da espécie *A. hydrophila*

As amostras foram submetidas aos testes bioquímicos comprovaram que a bactéria utilizada neste estudo era *A. hydrophila*.

As colônias sugestivas de *Aeromonas* sp, coletadas das placas com ágar vermelho de fenol apresentaram-se amareladas, com halo transparente devido à hidrólise do amido (ágar vermelho de fenol). A cultura apresentou desenvolvimento em meio TSA após 24 horas de incubação a 28 °C e no teste de esfregaço com coloração pelo método Gram, foi observado que as culturas se apresentavam as características de bactérias Gram-negativas.

Em TSI as culturas apresentaram reação ácida tanto na base como no bisel com formação de gás. As amostras mantidas em TSA para crescimento foram submetidas às provas da motilidade e apresentaram desenvolvimento em toda a extensão do tubo.

Ainda, nos testes de oxidase e catalase, as amostras foram positivas, com característica de esfregaços róseos e verificação de desprendimento de gás. Por meio destes testes todas as culturas comprovaram ser do gênero *Aeromonas*.

Após estes testes realizaram-se as demais provas bioquímicas para a comprovação da espécie. Essas provas foram: hidrólise da esculina, produção do indol, descarboxilação da ornitina e produção de acetoina (VP) a partir da glicose. Todas as culturas apresentaram resultados positivos, caracterizando a espécie *A. hydrophila*.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos conclui-se que:

O sanitizante composto por 15% de Glutaraldeído e 10% de Cloreto de dimetil cocobenzil foi classificado como extremamente tóxico para a tilápia (*Oreochromis niloticus*), porém se utilizado na concentração de $0,02 \text{ mL.L}^{-1}$ por 60 minutos de exposição, pode apresentar baixo risco de intoxicação ambiental.

A utilização das concentrações $0,01$, $0,02$ e $0,03 \text{ mL.L}^{-1}$ de do sanitizante por 60 minutos de exposição é considerada segura para tilápias, independente do tamanho dos peixes.

A utilização do sanitizante promoveu redução significativa ($p < 0,05$) de quase 1,5 log UFC de *A. hydrophila* por mL presente na pele dos peixes.

A utilização do sanitizante na água de criação de peixes na concentração de $0,02 \text{ mL.L}^{-1}$ ou $0,03 \text{ mL.L}^{-1}$ por 60 minutos de exposição foi mais eficaz na redução da população de *A. hydrophila* da pele do peixe do que na água de criação.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEYTA JÚNIOR, C.; KAYSNER, C.A.; WEKELL, M. M. Incidence of motile aeromonads from United States west coast shellfish growing estuaries. *J. Food Protec.*, v.53, p.849-855, 1990.
- ALBINATI, R. C. B. Aquicultura: cadeia produtiva e a inserção do médico veterinário e zootecnista. **Rev. Cons. Fed. Medic. Vet**, Brasília, v. 13, n. 40, p. 9-13, 2007.
- ALMEIDA FILHO, E. S.; SIGARINI, C. O.; DELMONDES, E. C.; STELATTO, E.; ARAUJO Jr., A. Características microbiológicas do pinato comercializados em supermercados e feiras-livres no município de Cuiabá-MT. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 99, 2002.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. APHA Committee on Microbiological Methods for Foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: American Public Health Association, p. 676, 2001.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. Ministério da Saúde. **Resolução RDC 12 de 02 de janeiro de 2001**. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da república Federativa do Brasil, seção 1:45-53. 10 de janeiro de 2001.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. Ministério da Saúde. Glutaraldeído em estabelecimentos de assistência à saúde – Informe técnico Nº 04/07, 2007.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT) NBR 15088. **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Métodos de ensaios com peixes**. São Paulo, p. 19, 2006.
- BALLANTYNE, B.; BERMAN, B. Dermal sensitizing potential of glutaraldehyde: a review and recent observations, **J. Toxicol. Cutan. Ocul. Toxicol**, v. 3, p. 251–262, 1984.
- BALLANTYNE, B.; MYERS, R. C. The acute toxicity and primary irritancy of glutaraldehyde solutions. **Vet. Hum. Toxicol**, v. 43, p. 193–202, 2001.
- BEAUCHAMP, R. O. J.; St. CLAIR, M. B.; FENNELL, T. R.; CLARKE, D. O.; MORGAN, K. T.; KARI, F. W. A critical review of the toxicology of glutaraldehyde, **Crit. Rev. Toxicol**, vol. 22, p. 143–174, 1992.

- BERNARDES, M. V. S.; MESQUITA, A. J.; NUNES, I. A.; SILVA, P.C.; RIOS, E. R.; MARQUES, L. R. S. Avaliação de três diferentes sanitizantes em viveiros de piscicultura pela contagem de bactérias do gênero *Aeromonas*. **Cienc. Anim. Bra.**, v.4, n. 1, p. 69-83, 2003.
- BIRGE, W. J.; BLACK, J. A.; WESTERMAN, A. G. Short-term fish and amphibian tests for the determining the effects of toxicant stress on early life stages and estimating chronic values for single compounds and complex effluents. **Environ. Toxicol. Chem**, v. 49, p. 807-821, 1985.
- BOARI, C. A. PEREIRA, G.I.; VALERIANO, C Bacterial ecology of tilapia fresh fillets and some factors that can influence their microbial quality. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 863-867, 2008.
- BRITO, B. G.; BRITO, K. C. T. Utilização do desinfetante Omnicide[®] no controle da salmonelose em aves. **J. A hora Vet.**, v. 28, n. 167, p. 7-10, 2009.
- CARRASCHI, S. P.; CRUZ, C.; MACHADO NETO, J. G.; CASTRO, M. P.; BORTOLUZZI, N. L.; GÍRIO, A. C. F. Eficácia do florfenicol e da oxitetraciclina no controle de *Aeromonas hydrophila* em pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 63, n.3, p. 579-583, 2011.
- CASTILHOS, Z. C.; CASTRO, A. M.; RAMOS, A. S.; LIMA, C. A.; RODRIGUES, A. P. C. Avaliação de risco à saúde humana: conceitos e metodologia. Ed. Do Rio de Janeiro: Centro de Tecnologia Mineral, 2005, 54p.
- CHYTIRI, S.; CHOULIARA, I.; SAVVAIDIS, I.N.; KONTOMINAS, M. G. Microbiological, chemical and sensory assessment of iced whole and filleted aquacultured rainbow trout. **Food Microbiol.**, v. 21, n. 2, p. 157-165, 2004.
- COOPER, J. C. Review of environmental toxicity of quaternary ammonium halides. **Ecotox. Environ. Safety**, v. 16, p. 65-71, 1988.
- DASKALOV, H. The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. **Food Control**, v. 17, n. 6, p. 474-483, 2006.
- FAO. Food and Agriculture Organization. **Aspectos da qualidade associado ao pescado**. Disponível em:<www.fao.org/DOCREP/003/T1768P03/T1768P03.htm>. Acesso em: 31 de outubro de 2009.

- FAO. Food and Agricultural Organization. **Fisheries & Aquaculture *Oreochromis niloticus***. Disponível em: [www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis niloticus](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus)
Acessado em 27 jan. de 2010.
- FILHO, E. S. A.; SIGARINI, C. O.; RIBEIRO, J. N.; DELMONDES, E. C.; SELATTO, E.; ARAÚJO, J. R. A. Características microbiológicas do “Pintado” (*Pseudoplatystoma fasciatum*), comercializado em supermercados e feira livre no município de Cuiabá, MT, Brasil. **Higiene Alimentar**; v. 16(99), p. 84-88, 2002.
- GERMANO, P. M. L.; OLIVEIRA, J. C. F.; GERMANO, M. I. S. O pescado como causa de toxinfecções bacterianas. **Higiene Alimentar**, São Paulo, SP, v. 7, n. 28, p. 40-45, 1993.
- GHENGHESH, K. S.; EL-GHODBAN, A.; DKAKNI, R.; ABEID, S.; ALTOMI, A.; TAHRUNI, A.; MARIALIGETI, K. Prevalence, species differentiation, haemolytic activity, and antibiotic susceptibility of aeromonads in untreated well water. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 2, p. 169-173, 2001.
- GHERARDI, G.; BERTOLETTI, E. Procedimento para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. **São Paulo: CETESB/PROCOP**, 1990, 17p.
- GONZÁLEZ-FANDOS, E.; GARCIA-LINARES, M. C.; VILLARINO-RODRIGUEZ, A.; GARCIA-ARIAS, M. T.; GARCIA-FERNANDEZ, M.C.. Evaluation of the microbiological safety and sensory quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) processed by the sous vide method. **Food Microbiol.** v. 21, n. 2, p.193-201, 2004.
- HAIR, J. F. et al. Análise multivariada de dados. 5ª ed, 2005.
- HAMILTON, M. A., RUSSO, R. C. & THURFTON, R. B. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. **Environmental Science & Technology**, v. 11, no.7, p. 714-719, 1977.
- HANASHIRO A. Avaliação da qualidade higienico-sanitária e nutritiva de bêntos comercializados no bairro da Liberdade, São Paulo. **Dissertação de Mestrado**. São Paulo, Faculdade de Saúde Pública da USP, 2002.
- HEINZEL. J.S. The phenomena of resistance to disinfectants and preservatives. Critical Report on Applied Chemistry. Ed. Industrial biodices Wiley, v. 22, p. 52-67, 1988.

HEUZENROEDER, M. W.; WONG, C. Y. F.; FLOWER, R. L. P. Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates from *Aeromonas* spp.: correlation with virulence in a suckling mouse model. **FEMS Microbial Letters**, Amsterdam, v. 174, p. 131-136, 1999.

HOSHINA, T. Studies on red-fin disease of eel. Special Research Report of Tokyo University of Fisheries, v.6, p. 105, 1962.

HOZBOR, M. C.; SAIZ, A. I.; YEANNIS, A. M.; FRITZ, R. Microbiological changes and its correlations with quality indices during aerobic ice storage of sea salmon (*Pseudoperca semifasciata*) LWT- **Food Science and Technol.**, London, v. 39, n. 2, p. 99-104, 2006.

HUDSON, J. A.; LACY, K. M. Incidence of motile *Aeromonads* in New Zealand retail foods. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 54, n. 9, p. 696-699, 1991.

KAPER, J. B.; SEIDLER, R. L.; LOCKMAN, H.; COLWELL, R. R. *Aeromonas hydrophila*: Ecology and toxigenicity of isolation from na estuary. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 50, p. 359-377, 1981.

KIM, S. R.; PARK, K.H.; KIM, D.W.; JUNG, S.J.; KANG, S.Y.; OH, M.J. et al. Antimicrobial effects of chemical disinfectants on fish pathogenic bacteria. **Food Science and Biotechnology**, v. 17, n. 5, p. 971-975, 2008.

KIRKAN, S.; GÖKSOY, E. Ö.; KAYA, O. Isolation and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas salmonicida* in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) in Turkey hatchery farms. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v. 50, p. 339-342, 2003.

KIROV, S. M. In: Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers: Doyle, M. P.; Beuchat, L. R.; Montville, T. J. (Eds.). ***Aeromonas* and *Plesiomonas* species**. Washington D. C.: ASM Press, p. 265-287, 1997.

KOŁODZIEJSKA, I.; NIECIKOWSKA, C.; JANUSZEWSKA, E.; SIKORSKI, Z.E. The Microbial and Sensory Quality of Mackerel Hot Smoked in Mild Conditions. **Lebensmittel – Wissenschaftund- Technologie**, v.35,n.1, p. 82-92, 2002.

- LEITÃO, M. F. F.; SANTOS, L. C.; MYIA, E. E.; SHIROSI, I.; KAI, M. Influência da temperatura ambiental na natureza e potencial deteriorador da microbiota bacteriana de peixes em ambientes lacustres tropicais. **Coleção ITAL**, Campinas, v. 23, n. 1, p. 85-97, 1993.
- LEITÃO, M. F. F.; SILVEIRA, N. F. A. *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas shigelloides* na água, pescado e hortaliças, no estado de São Paulo. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 90-99, 1991.
- LEUNG, H. W. Ecotoxicology of Glutaraldehyde: review of environmental fate and effects studies. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.49, p. 26-39, 2001.
- LU, C. P. Pathogenic *Aeromonas hydrophila* and the fish diseases caused by it. **Jornal of Fisheries of China**, v. 16, p. 282-288, 1992.
- Mac FADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Baltimore: The Williams & Wilkins Co., 1976, p. 312.
- MAREGONI, N. G. Produção tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (linhagem Chitralada), cultivada em tanques-rede sob diferentes densidades de estocagem. **Revista Arquivos de Zootecnia**, v. 55, n. 210, p. 127-138, 2006.
- MARTINS, L. M.; MARQUEZ, R. F.; YANO, T. Incidence of toxic *Aeromonas* isolated from food and human infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 32, p. 237-242, 2002.
- MARTTY, H. **Los peces y sus enfermedades**. Buenos Aires: Albatros, v. 2, p. 25-27 1986.
- MERINO, S.; RUBIRES, X.; KNOCHER, S.; THOMAS, J. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 28, p. 157-168, 1995.
- MCKELVEY, J. A.; GARMAN, R. H.; ANUSZKIEWICZ, C. M.; TALLANT, M. J.; BALLANTYNE, B. Percutaneous pharmacokinetics and material balance studies with glutaraldehyde, **J. Toxicol. Cutan. Ocul. Toxicol**, v. 11, p. 341–367, 1992.

- MOLLERKE, R. O.; WIEST, J. M.; CARVALHO, H. H. C. Colimetrias como indicadores de qualidade de pescado artesanal do lago Guaíba, em Porto Alegre, RS. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 99, p. 102-106, 2002.
- NEDOLUHA, P. C., WESTHOFF, D. Microbiology on striped bass grown in three aquaculture systems. **Food Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 255-264, 1997.
- NEEPER-BRADLEY, T. L.; BALLANTYNE, B.; Two-generation reproduction study by dosing with glutaraldehyde in the drinking water of CD rats, **J. Toxicol. Environ. Health A**, v. 60, p. 107–129, 2000.
- National Industrial Chemicals Notification Assessment Scheme (NICNAS) *Priority Existing Chemical. Glutaraldehyde. Full Public Report. Australian Government Publishing Service*,. V. 3, 1994.
- OGAWA, M.; OGAWA, Norma B. Perdigão. Alterações do pescado *post mortem*. **Manual da pesca**. São Paulo: Varela, cap. 8, p. 113-137, 1999.
- PACHECO, T. A., LEITE, R. G. M., ALMEIDA, A. C., SILVA, M. N. O., FIORINI, J. E. Análise de coliformes e bactérias mesófilas em pescados de água doce. **Higiene Alimentar**; v. 18, n. 116/117, p. 68-72, 2003.
- PALUMBO, S. A.; MAXINO, F.; WILLIAMS, A. C.; BUCHANAN, R. L.; THAYER, D. W. Starch-ampicillin agar for the quantitative detection of *Aeromonas hydrophila*. **Appl. and Environm. Microbiol.**, Washington, v. 50, p. 1027-1030, 1985.
- PATHAK, S.P., BHATTACHERJEE, J.W., KALRA, N. et al. Seasonal distribution of *Aeromonas hydrophila* in river water and isolation from river fish. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 65, p. 347-352, 1988.
- PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO M., R. Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. Maringá: Nupélia, p. 264, 1997.
- POFFÉ, R.; BEECK, E. O. P. Enumeration of *Aeromonas hydrophila* from domestic wastewater treatment plants and surface waters. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 71, p. 366-370, 1991.
- POPMA, T., MASSER, M. Tilapia. Life History and Biology. **Southern Regional Aquaculture Center**, v. 283, 1999.

- RADU, S.; AHMAD, N.; LING, F. H.; REEZAL, A. Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species from retail fish in Malaysia. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 81, p. 261-266, 2003.
- REIFF, B.; LLOYD, L.; HOW, M. J. The acute toxicity of eleven detergentsto fish; results of aninterlaboratory exercise. **Water Research**, v. 13, p.207-210, 1979.
- ROTH, E.; ROSENTHAL, H. Fisheries and aquaculture industries involvement to control product health and quality safety to satisfy consumer-driven objectives on retail markers in Europe. **Marine Pollution Bulletin**, v. 53, n. 10-12, p. 599-605, 2006.
- ROUBACH, R.; CORREIA, E. S.; ZAIDEN, S.; MARTINO, R. C.; CAVALLI, R. O. Aqüicultura brasileira. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 76, p. 47-57, 2003.
- RUSSELL, A.D., HAMMOND, S.A., MORGAN, J.R., Bacterial resistance to antiseptics and disinfectants. **J. Hospital Infection**. V. 7, P. 213- 225, 1986.
- SAAD, S. M. I.; IARIA, S. T.; FURLANETTO, S. M. P. Motile *Aeromonas* spp in retail vegetables from São Paulo, Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 22-27, 1995.
- SAHA, D.; PAL, J. In vitro antibiotic susceptibility of bacteria isolated from EUS-affected fishes in India. **Letters in Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 34, p. 311-316, 2002.
- SIMON FRASER UNIVERSITY (SFU). The acute toxicity of glutaraldehyde to juvenile coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, 1993.
- SOUSA, J. A.; SILVA-SOUZA, A. T. Bacterial community associated with fish and water from Congonhas river, Sertaneja, Paraná, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 44, n. 4, p. 373-381, 2001.
- SOUZA, M. L. R. Comparação de seis métodos de filetagem, em relação ao rendimento de file e de subprodutos do processamento da Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 3, p. 1076-1084, 2002.
- SUNDHEIM, G.; LANGSRUD, S.; HEIR, E.; HOLK, A. L. **International Biodeterioration & Biodegradation**. V. 41, P. 235-239, 1998.

UNION CARBIDE CORPORATION ENVIRONMENTAL SERVICES (UCC).. The acute toxicity of 50% aqueous glutaraldehyde to the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Project No. 11506-61-05, 1978.

UNION CARBIDE CORPORATION ENVIRONMENTAL SERVICES (UCC). Glutaraldehyde ecological fate and effects studies. Project No. 29570, 1981.

USEPA. States Environmental Protection Agency. **Guidelines for Ecological Risk Assessment.**, 1998, p. 171.

VIVEKANANDHAN, G.; SAVITHAMANI, K.; HATHA, A. A. M.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 76, p. 165- 168, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Food Safety and Foodbord Illness.** Disponível em: URL:<http://www.who.int/inf-fs/en/fact237.html>> acessado em 8 de outubro de 2003.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxic. Aqua.** - Princípios e Aplicações. São Carlos, Editora Rima, 2008, p. 478.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis.** Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 1999.

ZUCKER, E. Hazard Evaluation Division - Standard Evaluation Procedure - Acute Toxicity Test for Freshwater Fish. **USEPA** Publication, v. 540, n. 9, p. 85-006, 1985.