

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**RELATÓRIO FINAL DE ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO DO
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA, REALIZADO JUNTO À PREVET -
LABORATÓRIO DE DIAGNÓSTICO E SANIDADE AQUÍCOLA (JABOTICABAL -
SP)**

**PROJETO DE INTERESSE: Dose Letal Mediana (DL₅₀) da bactéria
Francisella noatunensis subsp. *orientalis* para o peixe *Oreochromis niloticus***

Matheus Porto Cortezi

**JABOTICABAL - SP
2023**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

RELATÓRIO FINAL DE ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO DO
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA, REALIZADO JUNTO À PREVET -
LABORATÓRIO DE DIAGNÓSTICO E SANIDADE AQUÍCOLA (JABOTICABAL -
SP)

**PROJETO DE INTERESSE: Dose Letal Mediana (DL₅₀) da bactéria
Francisella noatunensis subsp. *orientalis* para o peixe *Oreochromis niloticus***

Matheus Porto Cortezi

Orientador: Prof. Dr. Estevam Guilherme Lux Hoppe

Relatório do Estágio Curricular em Prática Veterinária
apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, Unesp, para
graduação em Medicina Veterinária

JABOTICABAL - SP

2º SEMESTRE DE 2023

C828r

Cortezzi, Matheus Porto

Relatório Final de Estágio Curricular obrigatório do curso de Medicina Veterinária, realizado junto à Prevet - Laboratório de Diagnóstico e Sanidade aquícola (Jaboticabal - SP) : Projeto de interesse: Dose Letal Mediana (DL50) da bactéria *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* para o peixe *Oreochromis niloticus* / Matheus Porto Cortezzi. -- Jaboticabal, 2024

37 p. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Estevam Guilherme Lux Hoppe

1. Tilápia-do-Nilo. 2. Tilápia. 3. Bactérias. 4. Aquicultura. 5. Peixes. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



CERTIFICADO

Certifico que o Relatório de Estágio Curricular em Prática Veterinária foi apresentado à Banca Examinadora e aprovado, conforme especificações abaixo

TÍTULO: Relatório Final de estágio curricular obrigatório do curso de medicina veterinária, realizado junto à Prevet - Laboratório de Diagnóstico e Sanidade Aquícola (Jaboticabal - SP). Projeto de interesse: Dose Letal Mediana (DL50) da bactéria *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* para o peixe *Oreochromis niloticus*.

ACADÊMICO: Matheus Porto Cortezi

CURSO: Medicina Veterinária

ORIENTADOR: Prof. Dr. Estevam Guilherme Lux Hoppe

SUPERVISOR: Breno Manzini

LOCAL: Prevet - Laboratório de Diagnóstico e Sanidade Aquícola

(PERÍODO) Semestre: 2º Ano: 2023

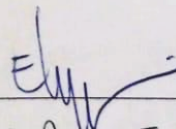
Jaboticabal, 15 de Janeiro de 2024

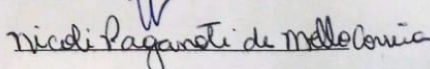
BANCA EXAMINADORA

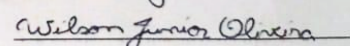
Presidente Prof. Dr. Estevam Guilherme Lux Hoppe

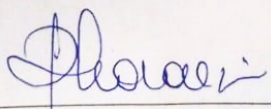
Membro Dra. Nicoli Paganoti de Mello Correia

Membro Dr. Wilson Junior Oliveira









Profª. Drª. Paola Castro Moraes
- Coordenadora da CEGRA -

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, em especial à minha mãe Patricia e meu pai Marcelo, por tornarem tudo isso possível.

Aos meus amigos, André, Sayuri, Mateus e Vinicius que estiveram presente e acompanharam minha jornada mesmo de longe.

Aos amigos que a faculdade me deu, especialmente ao Thaylon que me ajudou muito a me adaptar a esta nova realidade, ao meu grupo de sala composto pela Lara, Leticia, Luana e Mariana, aos amigos da república KilomB.O., em especial ao Vinicius e Bruno, todos vocês foram essenciais para esta conquista.

À bateria Batuka, onde fiz muitos amigos e lembranças, e que me ensinou não somente música, mas também liderança e planejamento.

Ao Prof. Dr. Estevam Guilherme Lux Hoppe, por aceitar ser meu orientador e sempre estar de prontidão para me auxiliar e esclarecer minhas dúvidas, além de todo ensinamento durante a graduação.

Ao Prevet - Laboratório de Diagnóstico e Sanidade Aquícola e seus funcionários, Andressa, Breno, Felipe e Nicoli, que foram indispensáveis para essa reta final da graduação, e além de me ensinarem muito, se tornaram ótimos amigos.

Agradeço à FCAV, em especial a turma LIX por tantos anos de convívio, e que apesar de tudo, se mostrou uma ótima turma, à LASP e seus membros, que trouxeram muitos ensinamentos e experiências, e aos residentes e funcionários do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário, em especial à Giovanna e Nayara, que apesar do curto período de estágio, e da rotina abarrotada, sempre tiveram tempo e disponibilidade para me ensinar.

Agradeço à Fapesp e ao CNPq pelas bolsas em iniciação científica durante minha graduação.

Agradeço ao Laboratório de Forragicultura, em especial à Mariane, que me acompanhou e me ensinou muito durante minha primeira iniciação científica.

Um agradecimento especial à minha namorada Gabriela, que esteve ao meu lado em todos momentos durante essa reta final, e que tem a capacidade de transformar até as coisas mais simples em momentos incríveis e inesquecíveis.

Por fim, agradeço a todos envolvidos na minha formação profissional, entre eles alunos, amigos, funcionários e professores, sem vocês nada disso seria possível, e é com muito orgulho que me formo como médico veterinário na melhor faculdade do Brasil.

“É que em cada experiência se aprende uma lição”

Almir Guineto

SUMÁRIO

I. RELATÓRIO DE ESTÁGIO.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO.....	2
3. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	5
4. DISCUSSÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	10
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	14
II. PROJETO DE INTERESSE.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1. QUALIDADE DA ÁGUA.....	16
2.2. <i>Oreochromis niloticus</i>	19
2.3. <i>FRANCISELLA</i> sp.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4. RESULTADOS.....	28
5. DISCUSSÃO.....	28
6. CONCLUSÃO.....	30
III. REFERÊNCIAS.....	30

I. RELATÓRIO DE ESTÁGIO

1. INTRODUÇÃO

Este relatório tem como objetivo a descrição e discussão das atividades realizadas pelo discente Matheus Porto Cortezi durante o período de Estágio Curricular em Prática Veterinária, o qual faz parte da grade curricular do curso de graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual paulista “Júlio de Mesquita Filho”, câmpus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Estevam Guilherme Lux Hoppe.

O Estágio Curricular em Prática Veterinária permite ao acadêmico vivenciar a realidade da profissão e colocar em prática todo conhecimento adquirido no decorrer do curso, sob a supervisão de um profissional experiente e capacitado. O cumprimento do estágio ocorreu durante o período de 31 de julho de 2023 a 20 de dezembro de 2023, em um único local concedente, perfazendo um total de 600 horas. O Prevet - Laboratório de Diagnóstico e Sanidade Aquícola está localizado na cidade de Jaboticabal, no endereço Avenida Olga Morello de Stéfani, 260 - Colina Verde, SP, 14887-364, com horário de funcionamento das 08:00 às 12:00 e das 13:30 às 17:30.

Por fim, este trabalho inclui a descrição e discussão de um dos experimentos que foi acompanhado durante o período de estágio na empresa, desenvolvido pelo setor de Pesquisa & Desenvolvimento da mesma.

2. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

A Prevet - Sanidade Aquícola (Figura 1) está localizada na cidade de Jaboticabal, no endereço Avenida Olga Morello de Stéfani, 260 - Colina Verde, SP, 14887-364, com horário de funcionamento das 08:00 às 12:00 e das 13:30 às 17:30. A empresa atua na área aquícola, tendo como pilares a Consultoria, Pesquisa & Desenvolvimento e Diagnósticos Laboratoriais de Enfermidades em Organismos Aquáticos.

A Pesquisa & Desenvolvimento é composta por dois biotérios com capacidade para vinte e seis caixas cada, um biotério com capacidade para quarenta aquários, um com capacidade para trinta aquários, um quarentenário, além de um amplo banco de cepas bacterianas originárias de isolamentos realizados em todo território nacional.

Os serviços laboratoriais realizados pela empresa consistem em análises Molecular Virais, Bacterianas, Microbiológico Completo (Necropsia, Isolamento Bacteriano, Gram, Antibiograma e Identificação Molecular), Histopatológico, Análise de Água, Bacteriológico com Antibiograma, além de Sorotipagem específica para *Streptococcus agalactiae* por procedimento Molecular e Sorológico.

Os biotérios e quarentenário (Figura 2) para Pesquisa & Desenvolvimento são todos equipados com aeradores para oxigenação, filtros para remoção dos resíduos, ar condicionado e termostatos para regulação da temperatura. O Biotério 01 tem capacidade para quarenta aquários com filtros individuais e o Biotério 02 para trinta, enquanto os Biotérios 03 e 04 possuem capacidade para vinte e seis caixas povoadas e vinte seis caixas-filtro.

O quarentenário consiste em dois tanques de 2500 litros cada para recebimento e quarentena dos peixes, além de um sistema robusto de três caixas-filtro por tanque, sendo a quarentena maneira eficaz de verificar a sanidade dos animais recebidos, e evitar contaminação por outro patógeno.

O laboratório é equipado com geladeiras e freezers para armazenamento de amostras e meios de cultura, estufas, *shakers*, microscópios, autoclave, vidrarias, aparelhos de reação em cadeia pela polimerase (PCR) convencional e PCR em tempo real (qPCR), fluxo laminar com luz UV para esterilização, pipetas de precisão, destilador de água e cromatógrafo, além de reagentes, *primers* e soluções necessárias às atividades exercidas.

A sala de coleta é dividida em área limpa e área suja, sendo a área limpa onde se localiza o fluxo laminar e se coleta as amostras para testes bacteriológicos, enquanto a área suja é destinada à necropsia e observação de sinais clínicos, além da coleta de amostras para as análises moleculares. Esta sala possui um fluxo laminar, luzes UV para esterilização tanto da sala quanto do fluxo, utensílios para necropsia, como bisturis e lâminas de bisturi, pinças e tesouras, além de equipamentos para coleta de amostra para análises microbiológica e molecular, como microtubos, *swabs*, alças bacteriológicas e lâminas. Os Equipamentos de Proteção Individual (EPI's) descartáveis, como luvas, toucas, propés, máscara e avental estão disponíveis para uso no laboratório, nos biotérios, na sala de coleta e no quarentenário, além de borrifadores contendo álcool 70% para higienização e *dispensers* de álcool em gel em todos os ambientes.

A equipe é composta por três funcionários, divididos em gerência, responsável pelo laboratório e responsável pela pesquisa & desenvolvimento, além de estagiários que auxiliam em todas as atividades.



Figura 1. Empresa Prevet, em Jaboticabal - SP.



Figura 2. Tanque 2 do quarentenário.

3. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

As atividades desenvolvidas pelos estagiários são divididas em atividades de manejo, atividades laboratoriais e atividades de montagem e limpeza de biotérios. Todas as atividades devem ser realizadas com a vestimenta adequada, sapato fechado e calça comprida, além da utilização de EPI's, sendo eles luvas, touca e jaleco. Para acessar qualquer área da empresa deve-se higienizar muito bem as mãos com álcool em gel e lavá-las com água e sabão, higienizar os calçados nos pedilúvios presentes em cada local de transição, e trocar os EPI's, por outros novos e limpos. Todo esse processo deve ser bem criterioso visto que a contaminação dos biotérios e laboratório acarretaria em alteração nos resultados de diagnóstico, além da alteração e invalidez dos resultados obtidos dos projetos de pesquisa e desenvolvimento. Há também a preocupação com a contaminação de ambientes externos, como rios e lagos presentes na cidade.

A limpeza dos biotérios consiste na desmontagem do biotério, vazio sanitário de 15 dias e remoção física de sujidades de toda instalação e seus componentes, para posterior desinfecção utilizando solução de hipoclorito de sódio (NaClO) e OMNICIDE AQUA®. A montagem dos biotérios (Figura 3A) é iniciada com a disposição das caixas de povoamento (caixas brancas) (Figura 3B) no topo das prateleiras e as caixas-filtro (caixas pretas) (Figura 3C) diretamente abaixo. As caixas brancas possuem um furo onde é encaixado internamente um cano para limitação do nível de água, e outro cano, este encaixado externamente, para direcionar a água excedente aos filtros. Também nestas caixas é colocado uma tela para evitar evasão dos peixes, e duas mangueiras de aeração, cada uma conectada a uma pedra porosa, para adequada oxigenação da água.

Nas caixas pretas é montado o sistema de filtragem de resíduos, composto por 8 tijolos, manta acrílica, mídias e a bomba de água responsável pela circulação e devolução da água pós-filtragem para a caixa de povoamento correspondente. Na montagem dos filtros é necessária a descloração da água, adição de bicarbonato de sódio para correção da alcalinidade e adição de sal mineral, de farelo de arroz e doses iniciais de probiótico, sendo o farelo essencial para início da colonização das

bactérias nitrificantes, fornecendo substrato para que haja crescimento e posterior melhora da conversão dos compostos nitrogenados para formas menos tóxicas.

As atividades de manejo incluem arraçoamento, análises de qualidade de água, sifonagem, aplicação de probiótico nos filtros, troca parcial de água, além da avaliação dos sinais clínicos e retirada dos animais mortos.

Diariamente, é realizada a aferição e registro da temperatura e nível de oxigênio da água, além do arraçoamento dos animais, sendo este último realizado no mínimo duas vezes ao dia.

Às segundas, quartas e sextas-feiras, são realizadas a coleta de água para análise de cloro (Figura 5C), pH (Figuras 5A e 5B), alcalinidade (Figura 6), amônia (Figuras 4A e 4B), nitrito (Figuras 4C e 4D) e nitrato, além da sifonagem e, caso necessário, a troca parcial de água.

Outras atividades de manejo incluem o recebimento dos peixes no quarentenário, e transferência dos peixes para os biotérios, sendo feita a aclimação dos peixes para diminuição do estresse causado e melhor adaptação ao ambiente.

Em relação às atividades laboratoriais, a depender da análise requisitada, é realizada a necropsia e avaliação macroscópica externa e interna, sendo registrado as alterações verificadas, juntamente com a incidência das mesmas no lote analisado. Após, realiza-se o isolamento microbiológico, coleta de órgãos para análise molecular viral ou bacteriana e histopatológico.

Há também as atividades mais rotineiras do laboratório, como lavagem de vidrarias, preparo de meios de cultura, esterilização e autoclavagem de materiais.



Figura 3. A. Biotério 03. **B.** Sistema de caixas de povoamento + caixas-filtro. **C.** Caixa-filtro.

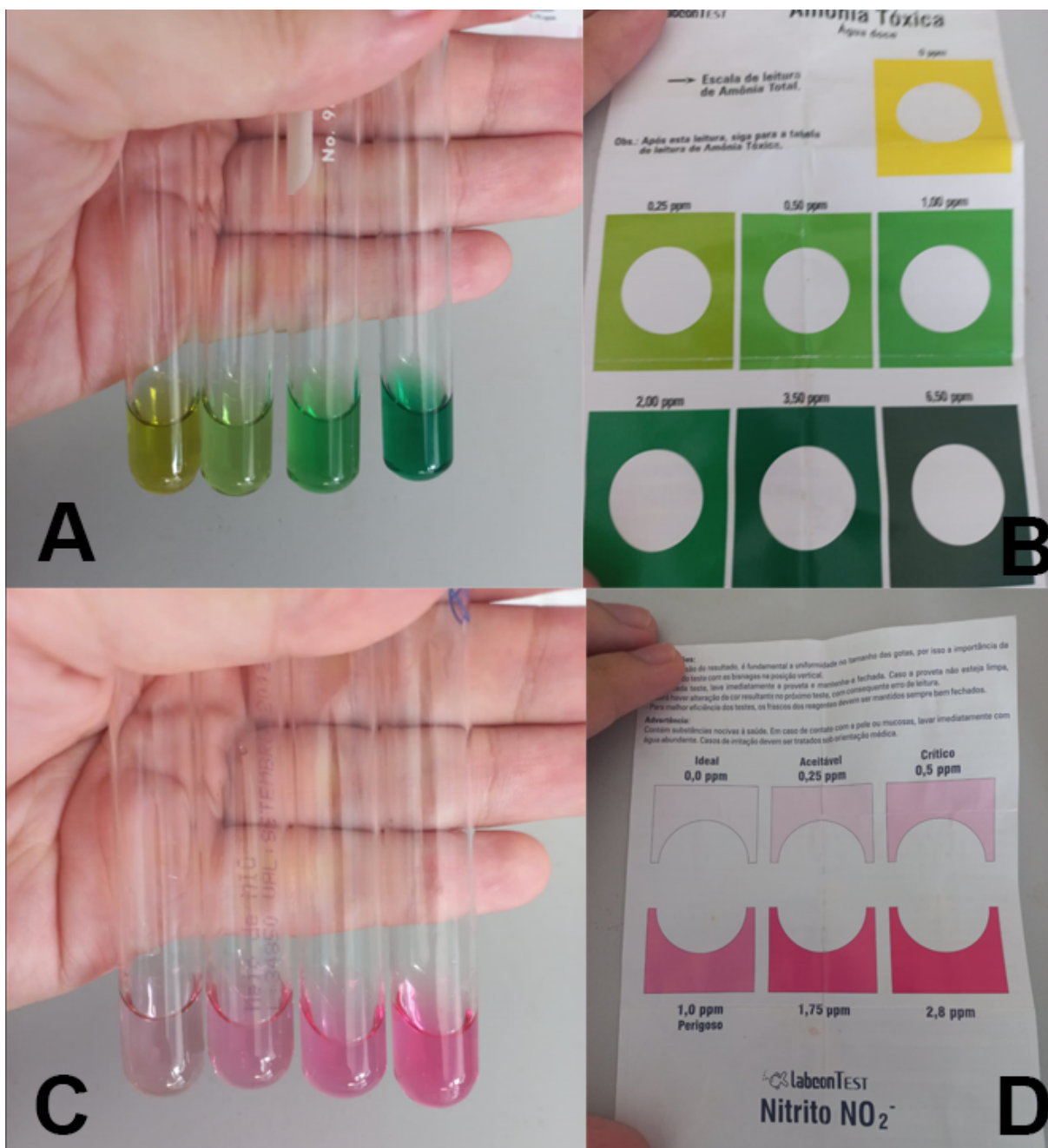


Figura 4. A. Testes de amônia tóxica. B. Legenda para leitura do teste de amônia tóxica. C. Testes de nitrito. D. Legenda para leitura do teste de nitrito.

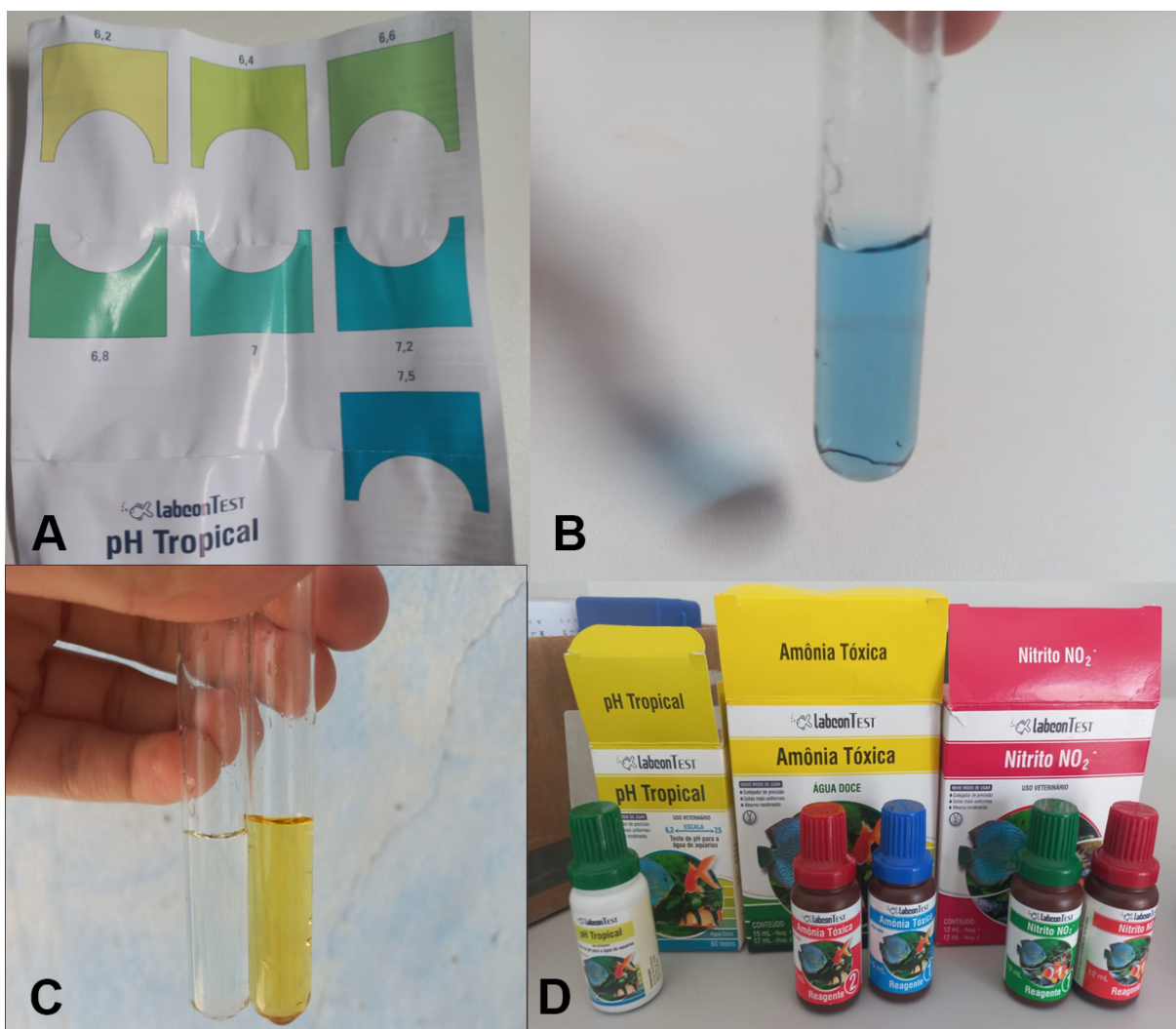


Figura 5. A. Legenda para leitura do teste de pH. B. Teste de pH. C. Teste de cloro negativo (à esquerda) e positivo (à direita). D. Reagentes para testes de qualidade da água.

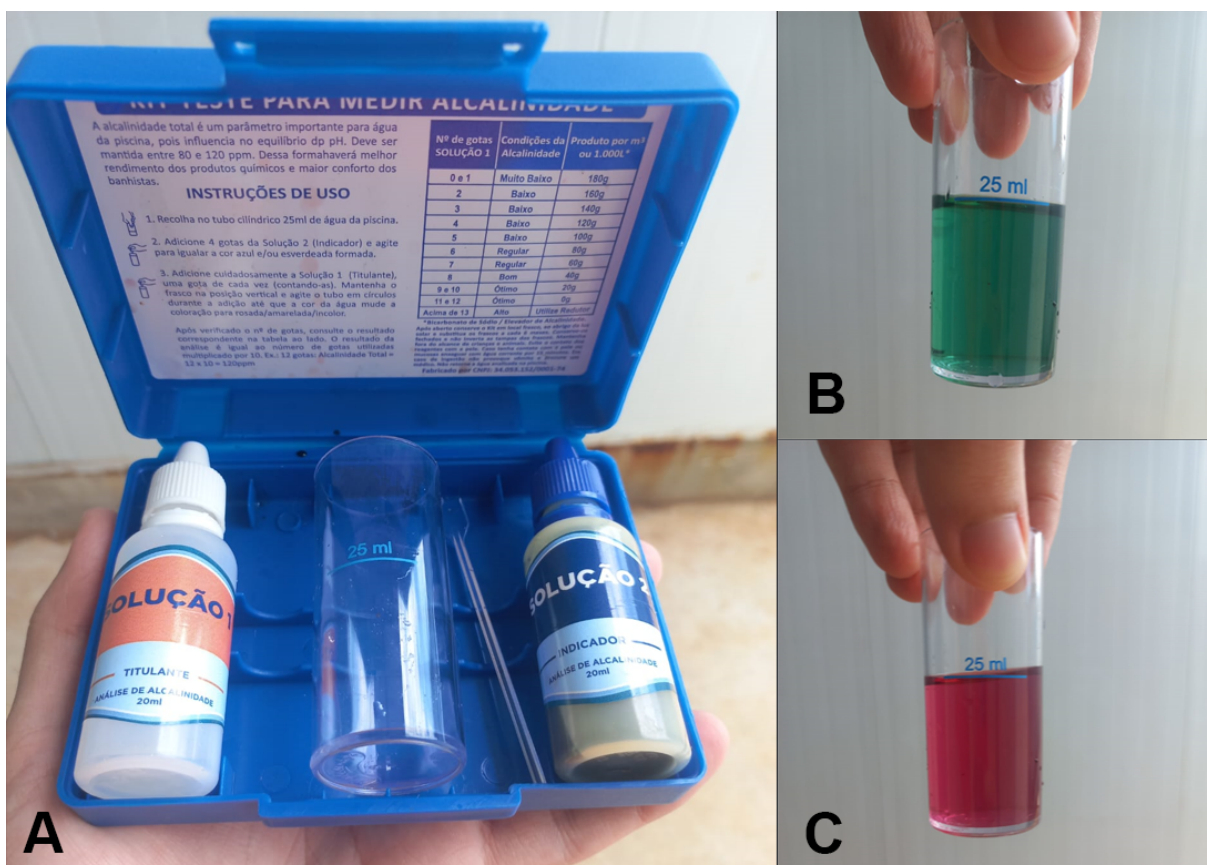


Figura 6. A. Kit para medir alcalinidade. **B.** Amostra após adição de 4 gotas da solução 2. **C.** Amostra após adição de 10 gotas da solução 1.

4. DISCUSSÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

É de imprescindível importância os devidos cuidados relacionados à higienização do ambiente, dos equipamentos utilizados e das mãos e calçados dos funcionários. Para higienização do ambiente é utilizada solução de hipoclorito de sódio. Para os pedilúvios, é preparada uma solução de OMNICIDE AQUA® diluído em água, sendo este produto utilizado também para desinfecção dos utensílios utilizados para manejo, como puçás e baldes, e componentes dos biotérios, como caixas, canos, mangueiras, bombas de água, mídias e telas. Este produto é pulverizado somente após a limpeza física dos equipamentos e utensílios, para melhor efeito desinfetante, e não deixa resíduos, já que é biodegradável pela luz solar. A utilização deste produto é feita sempre com uso de luvas e máscara.

A correta montagem do filtro e manejo da água é essencial para a manutenção de sua qualidade, visto que os compostos nitrogenados, amônia, nitrito e nitrato são considerados tóxicos aos peixes. A amônia, um dos mais preocupantes e tóxicos, é o principal produto das excreção dos peixes, sendo naturalmente oxidada em nitrito e posteriormente em nitrato, também potencialmente tóxicos. Todavia, o nitrato é tóxico apenas em altas concentrações para os peixes.

O objetivo do filtro é a criação de um biofilme, composto principalmente por bactérias nitrificantes, que se concentram nas mídias e na manta, e auxiliam na metabolização destes compostos nitrogenados, além de microrganismos que deterioram a matéria orgânica presente na água.

É importante a realização periódica da sifonagem da matéria orgânica acumulada e a troca parcial de até 30% do volume de água, com posterior reposição com água de boa qualidade, para auxiliar na diminuição da concentração dos compostos nitrogenados, e consequentemente reduzir a toxicidade e melhorar a qualidade da água. Das análises laboratoriais realizadas, as amostras são quase que completamente compostas por tilápias e seus híbridos em diversas fases de desenvolvimento, sendo as principais suspeitas infecções bacterianas como *Streptococcus agalactiae*, *Francisella* spp., *Edwardsiella* spp., *Aeromonas* spp., *Flavobacterium columnare* e o vírus da necrose infecciosa esplênica e renal (ISKNV).

Na área suja da sala de coleta é realizada a necropsia das amostras, que podem ser frescas, refrigeradas ou congeladas. A origem das amostras pode ser tanto dos biotérios, de acordo com o protocolo dos experimentos, quanto de produtores, que enviam amostras para monitoramento da sanidade e confirmação de suspeitas. Durante a necropsia é preenchida uma ficha contendo os dados do produtor e da amostra, juntamente com os sinais clínicos observados (Figura 7), além da coleta de amostra para diagnóstico molecular viral, sendo coletado o baço inteiro ou fragmentos, ou até mesmo o peixe inteiro, a depender de seu tamanho. Essas amostras são colocadas em microtubos contendo álcool em titulação acima de 70% para fixação, sendo posteriormente maceradas para melhor extração do produto final (DNA) utilizado na reação molecular. Em casos de larvas de peixes, por conta de seu tamanho, deve-se macerar o peixe inteiro. O objetivo principal desta

análise é a detecção do vírus ISKNV, causador da necrose infecciosa esplênica e renal, já que a detecção molecular de bactérias pode ser realizada após o cultivo.

A coleta de amostra microbiológica dos peixes é realizada dentro do fluxo laminar, na sala de coleta de forma estéril. É necessária a utilização de EPI's, e luvas sem talco para evitar alteração dos resultados. Também se deve borrifar álcool 70% nas luvas, utensílios e superfície do peixe a ser manuseado, sempre realizando esta higienização a cada amostra coletada. A semeadura das placas é realizada utilizando alças bacteriológicas descartáveis estéreis, essas inseridas nos órgãos alvo, a depender da suspeita clínica, e semeada em placas de Petri contendo o meio de cultura adequado ao isolamento da bactéria, conforme a Tabela 1. Após a semeadura, as placas são colocadas na estufa, com temperatura e tempo de incubação a depender da suspeita clínica, sendo posteriormente realizado as análises requisitadas, sendo comumente feita a lâmina e coloração de gram (Figura 8), para auxiliar na identificação da bactéria, e antibiograma, este importante para observar resistência ou sensibilidade à antibióticos.

Tabela 1. Suspeitas clínicas, órgão coletado e seus meios de cultura.

Suspeita Clínica	Órgão Coletado	Meio de Cultura
<i>Francisella</i> spp.	Rim e Baço	Mueller-Hinton enriquecido com soro fetal bovino (Meio C)
<i>Streptococcus</i> spp.	Rim e Cérebro	Brain and Heart Infusion (BHI) com ou sem adição de sangue
<i>Aeromonas</i> spp.	Rim e Cérebro	Brain and Heart Infusion (BHI)
<i>Flavobacterium</i> spp.	Brânquias	Meio ágar com adição de Tobramicina e sais (Meio F)
<i>Edwardsiella</i> spp.	Rim e Cérebro	Brain and Heart Infusion (BHI)

Solicitante:	ID Prevet:
Piscicultura:	Quantidade de amostra(s):
Cidade:	Peso médio do lote:
Data da coleta no laboratório:	Preservação da amostra: ☐ Vivos
Data da coleta no campo:	☐ Refrigerados
ID de origem:	☐ Congelados

Sinais Clínicos / Incidência

☐ Acúmulo de líquido ascítico _____ ☐ Aderência de órgãos _____ ☐ Ausência de olho _____ ☐ Brânquias pálidas _____ ☐ Caquexia _____ ☐ Corrosão nas nadadeiras _____ ☐ Corrosão severa de nadadeiras _____ ☐ Descamação _____ ☐ Endoftalmia bilateral _____ ☐ Endoftalmia unilateral _____ ☐ Esplenomegalia _____ ☐ Esteatose hepática _____ ☐ Estômago cheio _____ ☐ Estômago vazio _____ ☐ Exoftalmia bilateral _____ ☐ Exoftalmia unilateral _____ ☐ Fígado hemorrágico _____ ☐ Fígado pálido _____ ☐ Fígado pálido e friável _____	☐ Fígado pálido, friável e hemorrágico _____ ☐ Granulomas em baço _____ ☐ Granulomas em rim _____ ☐ Hemorragia ocular unilateral _____ ☐ Hemorragia ocular bilateral _____ ☐ Hemorragia intestinal _____ ☐ Hipoesplenismo _____ ☐ Intestino inflamado _____ ☐ Lesão em filé _____ ☐ Lesão em opérculo _____ ☐ Lesões difusas pelo corpo _____ ☐ Lesões em brânquias _____ ☐ Lesões hemorrágicas difusas pelo corpo _____ ☐ Manchas esbranquiçadas difusas pelo corpo _____ ☐ Nadadeiras hemorrágicas _____ ☐ Opacidade ocular bilateral _____ ☐ Opacidade ocular unilateral _____ ☐ Pele escura _____ ☐ Pericardite _____ ☐ Nada digno de nota _____
Outros: 	

Figura 7. Ficha de coleta Prevet.

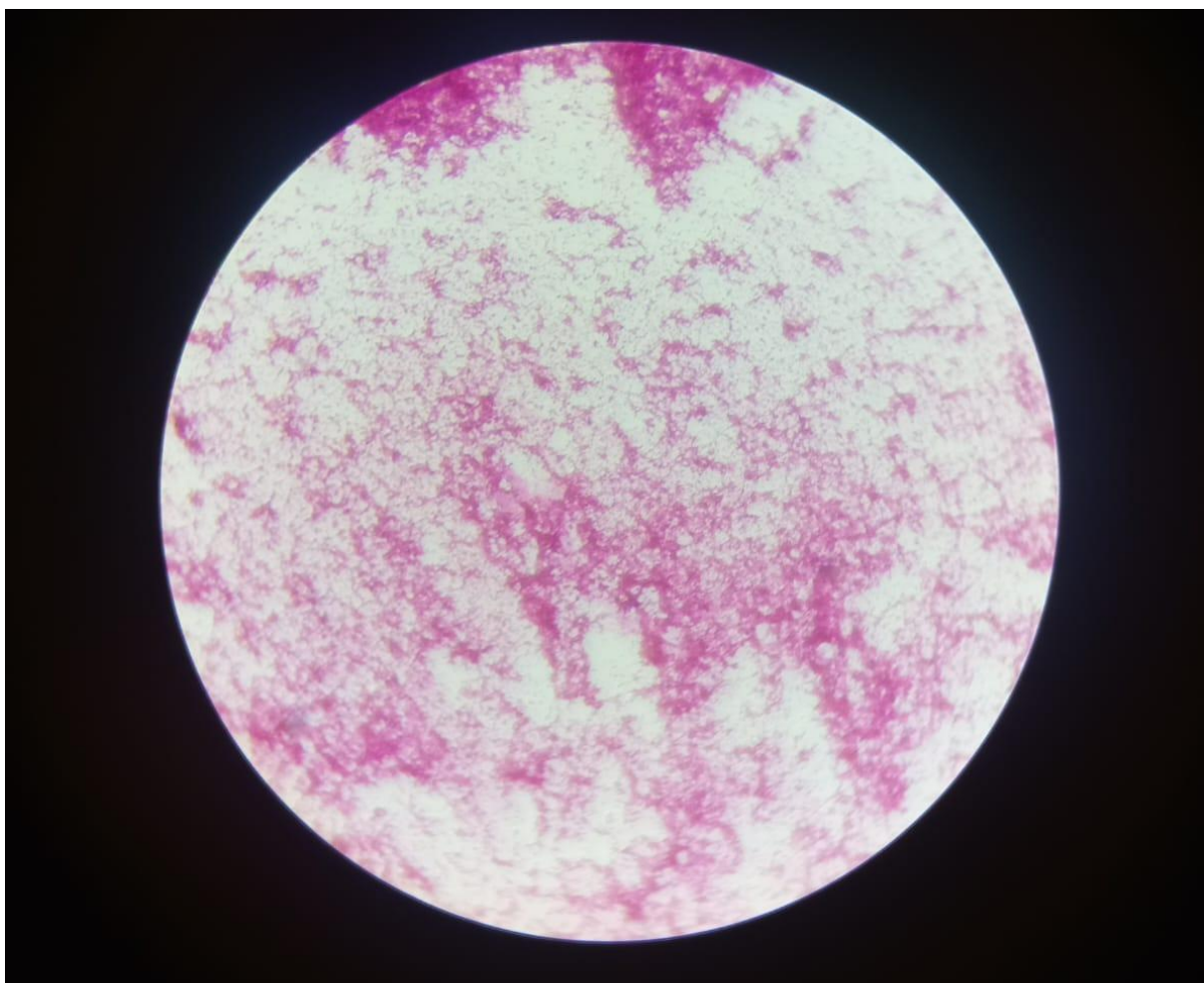


Figura 8. Coloração de Gram: *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* sob ampliação de 100 vezes.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização do estágio curricular na Prevet - Sanidade Aquícola foi essencial para a complementação da formação acadêmica e pessoal do discente, possibilitando-o relembrar e fixar conhecimentos adquiridos durante a graduação, como práticas laboratoriais, microbiologia, genética e histopatologia, além do aprendizado sobre aquicultura, uma área que apesar de pouco explorada durante o curso, está em crescente desenvolvimento e necessita da atuação do médico veterinário para o mesmo. O aluno se faz grato pela oportunidade de vivenciar e participar das atividades realizadas pela empresa, principalmente ao lado de bons profissionais dispostos a transmitir o conhecimento ao estudante.

II. PROJETO DE INTERESSE

DOSE LETAL MEDIANA (DL₅₀) DA BACTÉRIA *Francisella orientalis* PARA O PEIXE *Oreochromis niloticus*

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura é o setor de agronegócio com maior potencial de crescimento no Brasil, por conta da alta demanda e disponibilidade de fatores produtivos necessários a esta atividade (Xavier et al., 2021).

A tilápia (*Oreochromis niloticus*) está entre os peixes mais produzidos mundialmente, sendo o Brasil o quarto maior produtor, evidenciando a mudança de característica do produtor, que deixou de ser pequena e familiar, para se tornar grande e tecnificada (Xavier et al., 2021).

A sanidade aquícola tem importante papel para o crescimento desta atividade, visto que um dos maiores obstáculos que a produção de tilápias enfrenta é o aparecimento de doenças, capazes de causar grande morbidade e mortalidade, e com rápida disseminação entre os animais, devido ao ambiente aquático e comportamento dos animais (Pereira et al., 2019).

A franciselose, uma das principais doenças emergentes da produção de tilápias, é causada pela bactéria *Francisella* spp., e responsável por surtos em produções do mundo inteiro, gerando grande perda econômica (Pereira et al., 2019).

O experimento tem como objetivo determinar a dose letal mediana (DL₅₀) da bactéria *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* (FNO) em tilápias *Oreochromis niloticus*, a fim de determinar a concentração ideal em que ocorre o processo de infecção dos peixes, e consequente morte de 50% dos peixes presentes, sem ocorrer morte por bacteremia, e sim pela patogenia natural da bactéria.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. QUALIDADE DA ÁGUA

As características físicas, químicas e biológicas da água têm um papel vital na vida dos organismos aquáticos. A qualidade da água utilizada na aquicultura é um fator que influencia diretamente no desenvolvimento, alimentação, saúde e sobrevivência dos peixes (Figura 9) (Chainark e Boyd, 2010; Chaudhuri et al., 2012). Os estresses decorrente de alto nível de amônia e nitrito e baixa concentração de oxigênio dissolvido podem impedir o peixe de se alimentar adequadamente, gerando mortalidade por acúmulo de amônia nos tecidos e sangue, baixa qualidade de água e falta de oxigênio (Dias et al., 2012).

Os parâmetros físico-químicos da água como pH, oxigênio, temperatura, alcalinidade, nutrientes e presença de compostos tóxicos são capazes de influenciar na densidade de espécies bacterianas (Gorlach et al., 2013). Para os peixes, a temperatura da água é um fator que afeta significativamente sua fisiologia, sendo um aumento nela capaz de aumentar a taxa metabólica e consequentemente o consumo de energia, necessitando de maior quantidade de alimento e afetando suas demandas metabólicas (Byström et al., 2006; Lefébure, 2012).

A baixa concentração de oxigênio dissolvido está associada a estresse, queda no apetite, crescimento lento, susceptibilidade a doenças e mortalidade. As taxas de crescimento diminuem gradativamente e significativamente conforme as concentrações de oxigênio dissolvido caem (Boyd, 2010; Abd et al., 2022). Concentrações de oxigênio dissolvido na água aquém do mínimo afetam além da respiração, a alimentação dos peixes, causando inapetência, além de aumentar a toxicidade ao nitrato e amônia (Mallya, 2007; Nehemia et al., 2012; Abd et al., 2022).

Desvios na faixa ideal de pH podem influenciar na sobrevivência e performance produtiva dos peixes, e quando desafiados por condições extremas de pH, os peixes mudam seu comportamento e fisiologia (White et al., 2015). Acredita-se que embora os peixes consigam se adaptar a níveis estressantes de pH, criá-los nessas condições deve ser evitado (Rebouças et al., 2015). A alcalinidade é um parâmetro intimamente relacionado com o pH, indicando a capacidade do ambiente de tamponar ácidos, sendo recomendado controlar o nível de alcalinidade para prevenir possíveis alterações no pH (Kubitza, 2013).

A amônia é o principal resíduo nitrogenado eliminado pelos peixes, sendo principalmente removido do ambiente pelas plantas e bactérias, e é solúvel em água, principalmente em níveis baixos de pH. Na água é encontrado amônia na forma não ionizada (NH_3) e ionizada (NH_4^+), a depender da temperatura e pH. A concentração da forma não ionizada aumenta de acordo com o aumento do pH e é tóxica para os peixes (Stone e Thomforde, 2004; Abd et al., 2022).

Em outro estudo sobre essa relação entre pH e níveis de amônia não ionizada, foi observado que com o pH 7, menos de 1% da amônia se encontrava na forma tóxica não ionizada, chegando a 80-90% em pH 10 (Nehemia et al., 2012).

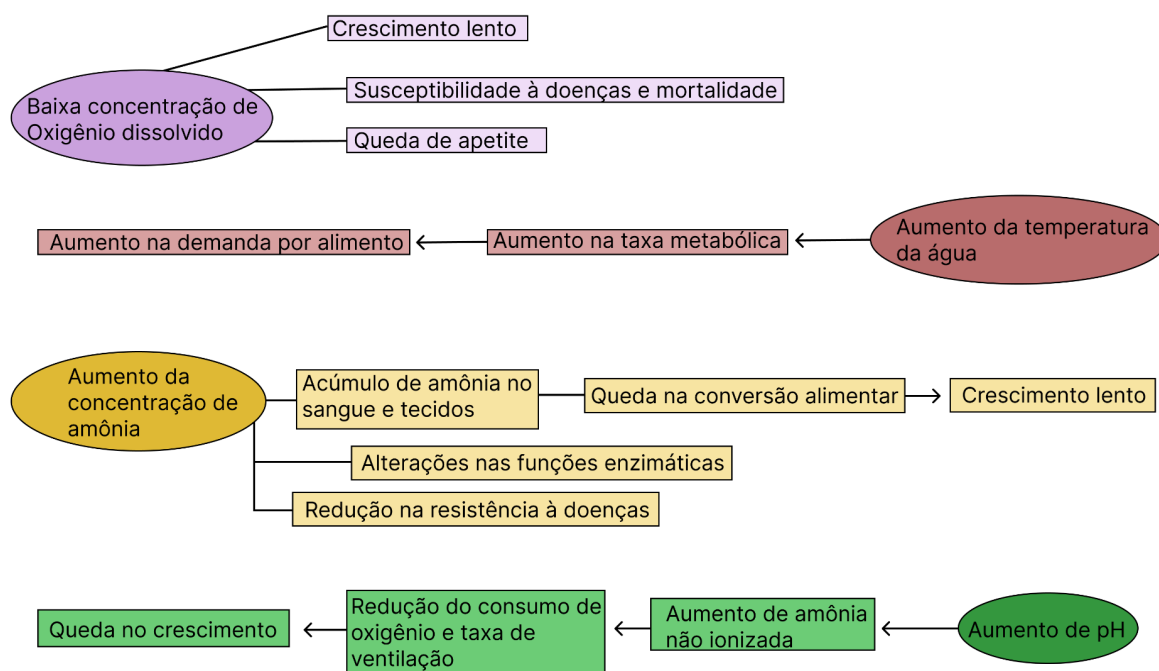


Figura 9. Fluxograma de impacto dos parâmetros de qualidade da água no cultivo de tilápias. Fonte: Adaptado de Mohamed E. Abd El-Hack, 2022.

A proporção de amônia não ionizada para amônia ionizada aumenta em 10 para cada aumento de 1 unidade de pH e aumenta em 2 para cada aumento de 10 graus de temperatura. (Levit, 2010)

Nitrito e nitrato são compostos de menor toxicidade em relação à amônia, sendo produtos da conversão da mesma, porém necessitando de concentrações maiores para causar intoxicação (Kubitza et al., 2013; Rodrigues et al., 2013).

Níveis altos de nitrito afetam funções fisiológicas de animais aquáticos, como regulação de íons, funções cardiovasculares, respiratórias e endócrinas, podendo levar até a alta mortalidade (Ciji et al., 2012; Lin et al., 2018). Há também relatos de deformidades, nado errático e problemas de saúde gerais em peixes expostos a concentrações elevadas (60-100 mg/L) de nitrato. (Martins et al., 2009; Davidson et al., 2011; Davidson et al., 2014). Zhang et al. (2023) verificaram que concentrações de 0,5-1 mg/L de nitrito e 2-8 mg/L de nitrato reduziram significativamente o ganho de peso dos peixes analisados.

2.2. *Oreochromis niloticus*

A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é um peixe exótico, pertencente à ordem dos Perciformes, família Cichlidae. É uma das principais espécies de peixe cultivadas comercialmente, devido à sua alta capacidade de adaptação a todos sistemas de produção e diferentes níveis de salinidade da água, sendo considerado o segundo grupo de peixes mais produzidos no mundo. A partir de 2010, a espécie *O. niloticus* constitui 80% das tilápias produzidas mundialmente (Rodrigues et al., 2013).

As características das tilápias que as tornam interessantes ao produtor são a facilidade de reprodução e obtenção de alevinos, a possibilidade de reversão sexual para produção de machos, aceitação de diversos alimentos, resistência a doenças, excelente crescimento em cultivo intensivo e facilidade de cultivo. A reversão sexual é feita durante a fase de pós-larva, fornecendo rações com hormônios masculinizantes. O cultivo de populações compostas somente por machos é indicado pois, além dos machos terem maior crescimento, *O. niloticus* é uma espécie de maturação sexual precoce, e pode acabar se reproduzindo durante a engorda, trazendo queda no retorno econômico. (Rodrigues et al., 2013).

A tilápia é muito bem-vista também pelo consumidor, tendo características atrativas como carne branca e de textura firme, sabor delicado e fácil filetagem, ausência de espinhas em “Y”, ausência de odor desagradável, tendo uma boa aceitação em relação ao sabor, valor nutritivo e preço (Souza, 2002; Simões et al., 2007).

A tilápia do Nilo é uma espécie onívora, tendo como alimento em ambiente natural insetos aquáticos, fitoplâncton, algas bentônicas e pequenos crustáceos, também aceitando facilmente a ração em cativeiro (Rodrigues et al., 2013). Em relação ao ambiente adapta-se bem em temperaturas de 14 a 33°C em ambientes de água doce, podendo também se adaptar a ambientes com maior salinidade,

tolerando salinidades de até 24 ppm, com leves sinais de estresse (Rodrigues et al., 2013; Fuadi et al., 2021).

A temperatura ótima para crescimento das tilápias do Nilo é entre 29-31°C, tendo aproximadamente 30% de redução no potencial de crescimento entre 20-22°C. A temperatura mínima letal é por volta de 10 a 11°C, e temperaturas acima de 37°C apresentam aumento no estresse e susceptibilidade à doenças. (Nehemia et al., 2012). Em um estudo de Mjoun et al. em 2010 verificaram que a temperatura ótima para criação de tilápias é de 22-29°C, sendo reforçada esta constatação por Mirea em 2013, que em seu estudo obteve como intervalo de temperatura ideal para criação intensiva de tilápias entre 20-30°C, visando o crescimento e taxa de sobrevivência adequada.

Em relação à concentração de oxigênio dissolvido, em geral, as tilápias atingem seu potencial máximo de crescimento com concentrações acima de 3mg/L, não devendo cair abaixo de 1mg/L (Mallya, 2007; Boyd, 2010).

As tilápias, estando com suas características físicas e biológicas reguladas, conseguem se desenvolver ao seu tamanho e potencial máximo em diversos habitats (Olurin & Aderibigbe, 2006). Deve-se atentar a preocupação ambiental das tilápias serem possíveis ameaças a outros organismos aquáticos, decorrente dessa alta capacidade desses peixes em sobreviver a diversas condições ambientais, incluindo qualidade da água e manipulação física. (De Long et al, 2009)

O pH da água e nível de amônia são parâmetros críticos para produção de tilápias. (Abd et al., 2022). O crescimento de alevinos de tilápias do Nilo foi significativamente reduzido em pH de 6 e 9, sendo ideal o pH na faixa de 7 a 8. (El-Sherif & El-Feky, 2009)

2.3. FRANCISELLA sp.

Francisella spp. é um cocobacilo gram negativo, imóvel, intracelular facultativo e aeróbio estrito responsável por causar perdas econômicas consideráveis em

produções de tilápias (Rodrigues et al., 2018). *Francisella* é uma bactéria de grande importância para produção de tilápias e seus híbridos, sendo inclusive uma doença de notificação obrigatória, conforme a Portaria MPA Nº 19, de 04 de Fevereiro de 2015 (BRASIL, 2015). Há relatos de detecção de *Francisella* sp. ao redor do mundo, sendo responsável por mortalidade em tilápias e outras espécies de águas frias ou quentes, em países como Taiwan, China, Costa Rica, Brasil, Reino Unido (Chern e Chao, 1994; Soto et al., 2009; Jeffery et al., 2010; Lin et al., 2016; Rodrigues et al., 2018).

A franciselose é uma doença sistêmica de alta mortalidade e sinais inespecíficos, podendo apresentar nos peixes, caquexia, anemia, esplenomegalia, acúmulo de líquido ascítico e presença de lesões granulomatosas disseminados principalmente em baço e rim (Soto et al., 2009).

Colquhoun e Duodo, em 2011, também relataram acentuada morbidade, mortalidade e presença de lesões granulomatosas em múltiplos órgãos nos peixes com franciselose. A transmissão dessa bactéria pode ocorrer de forma horizontal, por contato direto entre peixes, pela água contaminada, ou por canibalismo, e de forma vertical, passada dos reprodutores a sua prole através dos ovos (Mauel et al., 2003; Soto et al., 2009a; Soto et al., 2009b; Jeffery et al., 2010; Pradeep et al., 2017).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Prevet – Laboratório de Diagnóstico e Sanidade Aquícola (Jaboticabal, SP) no período de 07 de novembro de 2023 até 05 de dezembro de 2023. No dia 07 de novembro de 2023 chegaram 231 peixes que foram distribuídos em 21 caixas de polipropileno (11n por caixa).

Abaixo de cada caixa de polipropileno (Figura 10), foi montado uma caixa, também de polipropileno, para uso como filtro e circulação da água. A caixa-filtro é composta por 8 tijolos, mídias, uma manta de acrílico dobrada e a bomba de circulação, a qual retorna água para a caixa de povoamento. Os tijolos e manta

retêm os dejetos dos peixes, enquanto que a manta e as mídias servem como substrato para as bactérias nitrificantes se alojarem e ficarem concentradas, com o intuito de auxiliar na oxidação dos compostos nitrogenados.

Após o recebimento, os animais (Figura 11) passaram por um período de aclimação antes do alojamento definitivo nas caixas onde foi realizado o experimento. Para minimizar o estresse, é realizada a mistura da água nas mesmas proporções em que os peixes estão com a água da caixa onde ficarão. A duração da aclimação é de aproximadamente 20 minutos. Este procedimento é importante para que os parâmetros de qualidade da água (oxigênio, temperatura, alcalinidade e pH) se igualem para que o animal não sofra de altos níveis de estresse ou choque térmico. Se este procedimento não for realizado de forma correta, há o risco de altas taxas de mortalidade maior susceptibilidade a bacterioses oportunistas.

Após a soltura, as tilápias permaneceram em quarentena por 15 dias para a observação da sanidade desses organismos que seriam utilizados na experimentação. O arraçoamento foi fornecido duas vezes ao dia, na proporção de 3,0% do peso do animal.

Após o período da quarentena (15 dias), foram selecionados 210 peixes com peso médio entre $10,0 \pm 2,0$ g e redistribuídos em delineamento inteiramente casualizado em 21 caixas e desafiados com a bactéria *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* (*Fno*) (Figura 14). Para isso, foram utilizados sete grupos experimentais, em triplicata, contendo 10 animais por repetição, sendo inoculados da seguinte forma:

G1: receberam uma concentração bacteriana de 10^8 Unidades Formadoras de Colônia/mililitro de água (UFC/mL)

G2: receberam uma concentração bacteriana 10^7 UFC/mL

G3: receberam uma concentração bacteriana 10^6 UFC/mL

G4: receberam uma concentração bacteriana 10^5 UFC/mL

G5: receberam uma concentração bacteriana 10^4 UFC/mL

G6: receberam uma concentração bacteriana 10^3 UFC/mL

G7: receberam solução salina – controle negativo

Diariamente foram aferidos temperatura e oxigênio com a utilização de um oxímetro, para garantir que tais parâmetros estivessem nos limites aceitáveis tanto para a saúde dos peixes como para a manifestação da bacteriose durante a condução do estudo.

Três vezes na semana, foram realizadas análises da qualidade da água: amônia, nitrito, nitrato, pH e alcalinidade por meio da utilização de testes colorimétricos.

Após a realização das análises de água, as medidas corretivas eram aplicadas sempre que necessário de acordo com o parâmetro fora do padrão. Para o controle de amônia, eram realizadas sifonagens periódicas para retirada de matéria orgânica da água, com troca parcial de 30% do volume de água, repondo-a com água limpa e de boa qualidade. Após isso era feita a aplicação de probiótico (contendo *Bacillus cereus* var. *toyoj*, *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus acidophilus*) para contribuir com a metabolização dos compostos nitrogenados, através de bactérias que convertem a amônia em nitrito e este em nitrato, levando o ambiente a um constante equilíbrio. A alcalinidade era corrigida com a utilização de bicarbonato de sódio alimentar, para garantir uma condição favorável às bactérias nitrificantes.

As caixas eram oxigenadas com compressores radiais para manter o oxigênio acima de 3,0 mg/L que é o adequado para a espécie. A temperatura foi controlada por meio de ar-condicionado que mantinha a sala experimental em 24°C aproximadamente, para que a temperatura da água ficasse adequada durante o período de realização do experimento.

Para realização do desafio bacteriano foram administradas 6 gotas de eugenol por caixa, sendo desligadas as bombas de circulação, para facilitar a captura dos animais e redução do estresse pelo manuseio. Em cada caixa, os peixes foram retirados e colocados em baldes contendo água e eugenol, a fim de anestesiá-los para o procedimento.

O procedimento seguiu os grupos e concentração de inóculo crescente, conforme descrito anteriormente, iniciando pelo grupo controle que recebeu solução salina, até chegar ao G1, este recebendo uma concentração bacteriana de 10^7 UFC/mL, sendo sempre realizada a troca de seringa e EPI's a cada tratamento. A inoculação foi feita pela via intraperitoneal (Figura 12). Ao fim da inoculação, os peixes foram devolvidos às suas respectivas caixas e observados até o fim dos efeitos do anestésico.

Após o desafio bacteriano, foram avaliados diariamente os sinais clínicos de manifestação da franciselose, bem como a mortalidade no decorrer de 21 dias. Durante o experimento, 10% dos peixes mortos foram submetidos à coleta dos rins e baço para isolamento microbiológico, com plaqueamento realizado em meio C (Mueller Hinton enriquecido com soro fetal bovino) a fim de confirmar a infecção por *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*.

Ao final do experimento, o restante dos peixes foram eutanasiados utilizando-se de dose letal de Eugenol (1 ml/L), e devidamente descartados. Com base nos dados de mortalidade, obteve-se a DL50 bacteriana da *Fno* para a tilápia *O. niloticus*. Os resultados serviriam de base para estudos futuros realizados com outras finalidades.



Figura 10. Sistema de caixa de povoamento e sua respectiva caixa-filtro.



Figura 11. Peixes da espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo).



Figura 12. Inoculação intraperitoneal de *Fno* em tilápias do Nilo durante período de desafio; anestesia de tilápias por imersão em água contendo eugenol..

4. RESULTADOS

A taxa de mortalidade dos peixes após 21 dias está descrita na Tabela 2. Com base nos dados, a DL_{50} da bactéria *Fno* foi de 10^5 UFC para as tilápias.

Tabela 2. Taxa de mortalidade dos peixes após 21 dias de desafio por *Fno*.

Grupos	Nº peixes mortos	Mortalidade (%)
10^8	30	100
10^7	30	100
10^6	24	80
10^5	15	50
10^4	09	30
10^3	03	10
Controle	0	0

Todos os peixes desafiados apresentaram sinais clínicos de letargia e inapetência. Além disso, alguns apresentaram escurecimento da coloração da pele. No grupo controle, nenhuma alteração foi observada ao longo do experimento, o que evidencia que os sinais clínicos apresentados nos peixes inoculados são relacionados à infecção pela *Fno*.

Ao longo do período do experimento, os parâmetros de qualidade da água mantiveram-se adequados aos peixes e às condições necessárias para o desenvolvimento bacteriano: oxigênio em $6,1 \pm 1,3$ mg/L e temperatura $24,7 \pm 0,7^\circ\text{C}$. A amônia total ficou na média de $0,3 \pm 0,2$ mg/L, o nitrito em $0,8 \pm 0,2$ mg/L e o nitrato em $1,8 \pm 2,0$ mg/L. Por fim, o pH foi de 7,5 e a alcalinidade entre 100 – 110.

5. DISCUSSÃO

Em um estudo realizado por Fernandez-Alarcon et al. em 2019, obteve-se a DL_{50} de Fno inoculada pela via intra-gástrica, tendo como resultado para essas circunstâncias a concentração bacteriana de 10^4 UFC para tilápias-do-Nilo (*O. niloticus*), resultado próximo ao obtido no presente estudo. A diferença entre os resultados pode estar associada às individualidades dos peixes inoculados, ou diferença na cepa utilizada para inoculação, visto que a via intraperitoneal necessita de menor concentração bacteriana para causar mortalidade, já que por esta via a bactéria não fica exposta ao sistema imune inato presente na pele, brânquias e mucosa dos peixes (Soto et al., 2009b; Fernandez-Alarcon et al., 2019). A mortalidade variou de 42,5 a 80% conforme aumentou-se a concentração, sendo possível que a maior concentração de inóculo foi responsável por uma manifestação mais aguda da doença (Fernandez-Alarcon et al., 2019). Neste mesmo estudo, os sinais clínicos apresentados foram letargia, lesões de pele, anorexia e corrosão de nadadeiras, sendo a letargia e anorexia observados em todos grupos desafiados. A quantidade de animais com sinais clínicos foi maior na concentração de inóculo de 10^5 UFC (Fernandez-Alarcon et al., 2019).

Macroscopicamente, foi possível observar a presença de nódulos brancos em diversos órgãos dos peixes infectados, lesões essas consistentes com lesões de franciselose. (Birkbeck et al., 2007; Soto et al., 2009a; Fernandez-Alarcon et al., 2019). Foi observada a relação da temperatura com a Fno, sendo necessária uma maior concentração bacteriana para causar morte de 50% da população de peixes infectados em águas a 28°C em relação aos grupos em águas a 22°C, obtendo uma DL_{50} de aproximadamente 10^6 para os grupos em maior temperatura, e 10^2 em grupos de menor temperatura (Pereira et al., 2019)

Outros estudos apontam também essa sazonalidade da doença, tendo a presença de sinais clínicos e mortalidade por franciselose somente quando a temperatura da água cai para 24-26°C. O impacto da temperatura de 30°C na ausência de mortalidade, contrastando com alta mortalidade a 25°C em infecções experimentais e pisciculturas Brasileiras em temperaturas mais frias pode ser associada a coinfeções por *Streptococcus agalactiae* (Soto, Abrams & Reva, 2012; Leal et al., 2014; Assis et al., 2017; Delphino et al., 2019).

A franciselose é uma das doenças de maior importância na produção de tilápia mundialmente, tendo mortalidades documentadas de até 95% em pisciculturas em Taiwan (Chern e Chao, 1994; Chen et al., 1994), e mais recentemente mortalidades de até 40% em pisciculturas do México (Ortega et al., 2016), e até 50% em alevinos e juvenis no Brasil (Sebastião et al., 2016).

Devido a importância dessa doença, estudos foram desenvolvidos em busca de métodos mais rápidos e sensíveis de detectá-la para prevenir surtos e iniciar mais previamente medidas de controle a fim de evitar que a doença se espalhe pelo plantel. Um desses estudos se baseia na utilização da técnica de Amplificação Isotérmica da Polimerase de Recombinase (RPA) ao invés da técnica de qPCR. A técnica de RPA é uma ótima possível alternativa para diagnóstico da *Fno*, devido a ela ser uma técnica molecular mais simples, mais rápida e de alta sensibilidade (Daher et al., 2016).

Shahin et al. (2018), após desenvolverem um ensaio de RPA para rápida detecção de *Fno*, obtiveram resultados promissores, conseguindo ter uma alta sensibilidade, bem próxima ao da qPCR, porém em um tempo muito menor, conseguindo o resultado em apenas 6 minutos, comparados aos 90 minutos necessários para o qPCR, tornando esta técnica muito atrativo futuramente para uso em larga escala.

6. CONCLUSÃO

Conforme os resultados obtidos, conclui-se que a concentração bacteriana de 10^5 UFC/ml da bactéria *Francisella noatunensis subsp. orientalis* é a mais adequada para realização de futuros experimentos envolvendo a inoculação em peixes *Oreochromis niloticus* nas mesmas condições zootécnicas, devido a esta concentração ser a responsável pela morte de 50% da população, e permitir a devida demonstração do curso evolutivo da doença.

III. REFERÊNCIAS

Abd El-Hack, M. E., El-Saadony, M. T., Nader, M. M., Salem, H. M., El-Tahan, A. M., Soliman, S. M., & Khafaga, A. F. Effect of environmental factors on growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). International journal of biometeorology, v. 66 n. 11, p. 2183–2194, 2022.

Assis, G. B., Tavares, G. C., Pereira, F. L., Figueiredo, H. C., & Leal, C. A. Natural coinfection by *Streptococcus agalactiae* and *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Journal of fish diseases, v. 40 n.1, p. 51–63, 2017.

Birkbeck, T., Bordevik, M., Frøystad, M., Baklien, Å. Identification of *Francisella* sp. from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Chile. Journal of fish diseases, v.30 (a), p. 505–507, 2007.

Boyd, C. E. Dissolved-oxygen concentrations in pond aquaculture, Global Aquaculture Alliance. Global aquaculture advocate January/February, 2010

BRASIL. Portaria MPA Nº 19, de 04 de Fevereiro de 2015. Define a lista de doenças de notificação obrigatória de animais aquáticos ao Serviço Veterinário Oficial (SVO). Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, p. 54. 09 de fevereiro de 2015. Seção 1.

Byström, P., Andersson, J., Kiessling, A., Eriksson, L-O. Size and temperature dependent foraging capacities and metabolism: consequences for winter starvation mortality in fish. Oikos, v. 115, n. 1, p. 43-52, 2006.

Chern, R. S., Chao, C. B. Outbreaks of a disease caused by rickettsia-like organism in cultured tilapias in Taiwan. Fish Pathology, 29(2), 61-71, 1994.

Chainark, S., Boyd C.E. Water and sediment quality, phytoplankton communities and channel catfish production in sodium nitrate-treated ponds. Journal of Applied Aquaculture. v. 22, n. 2, p.171–185, 2010.

Chaudhuri, K., Manna, S., Sarma, K.S., Naskar, P., Bhattacharyya, S., Bhattacharyya, M. Physiochemical and biologic. Factors controlling water column metabolisms in Sundarbans estuary, India. *Aquatic Biosystems*, v. 8, n. 1, p. 1-16, 2012.

Chen, S. C., Tung, M. C., Chen, S. P., Tsai, J. F., Wang, P. C., Chen, R. S., Adams, A. Systematic granulomas caused by a rickettsia-like organism in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), from southern Taiwan. *Journal of Fish Diseases*, 17(6), 591-599, 1994.

Ciji, A., Sahu, N. P., Pal, A. K., Dasgupta, S., & Akhtar, M. S. (2012). Alterations in serum electrolytes, antioxidative enzymes and haematological parameters of *Labeo rohita* on short-term exposure to sublethal dose of nitrite. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 38, p. 1355-1365, 2012.

Colquhoun, D. J., Duodu, S. *Francisella* infections in farmed and wild aquatic organisms. *Veterinary research*, v. 42, n. 1, p. 1-15, 2011.

Daher, R. K., Stewart, G., Boissinot, M., & Bergeron, M. G. Recombinase polymerase amplification for diagnostic applications. *Clinical chemistry*, v. 62, n.7, p. 947-958, 2016.

Davidson, J., Good, C., Welsh, C., & Summerfelt, S. The effects of ozone and water exchange rates on water quality and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* performance in replicated water recirculating systems. *Aquacultural Engineering*, v. 44, n. 3, p. 80-96, 2011.

Davidson, J., Good, C., Welsh, C., & Summerfelt, S. T. Comparing the effects of high vs. low nitrate on the health, performance, and welfare of juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* within water recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*, v. 59, p. 30-40, 2014.

Delphino, M. K. V. C., Leal, C. A. G., Gardner, I. A., Assis, G. B. N., Roriz, G. D., Ferreira, F., Figueiredo, H. C. P., & Gonçalves, V. S. P. Seasonal dynamics of

bacterial pathogens of Nile tilapia farmed in a Brazilian reservoir. *Aquaculture*, v. 498, p. 100–108, 2019

De Long D. P., Losordo T. M., Rakocy J. E. Tank culture of tilapia. Southern Regional aquaculture center (SARC) Publication No. 282. Education and Extension Service Grant. SRAC No. 2007–38500–18470, 2009.

Dias, J. D.; Simões, N. R.; Bonecker, C. C. Zooplankton community resilience and aquatic environmental stability on aquaculture practices: a study using net cages. *Brazilian Journal of Biology*, v. 72, p. 1-11, 2012.

El-Sherif, M. S., El-Feky, A. M. Performance of Nile tilapia fingerlings. Effect of pH. *International journal of agriculture and biology*, v. 11, p. 297–300, 2009.

Fernandez-Alarcon, M. F., et al. Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Challenged Infection By *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* Via an Intragastric Route Protocol, 2019.

Fuadi, A. A., Hasly, I. R. J., Azkia, L. I., & Irham, M. Response of tilapia (*Oreochromis niloticus*) behaviour to salinity differences: A laboratory scale study. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, v. 674, n. 1, 012060, 2021.

Gorlach-lira A., K. Pacheco, C., Carvalho, L. C. T., Melo Júnior, H. N., Crispim, M. C. The influence of fish culture in floating net cages on microbial indicators of water quality. *Brazilian Journal of Biology*, v. 73, p. 457-463, 2013.

Jeffery, K. R. Stone, D., Feist, S. W., Verner-Jeffreys, D. W. An outbreak of disease caused by *Francisella* sp. in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* at a recirculation fish farm in the UK. *Diseases of aquatic organisms*, v. 91, n. 2, p. 161-165, 2010.

Kubitza, F. Qualidade da água no cultivo de peixes e camarões. Jundiaí, Fernando Kubitza (ed.), 2a edição, p. 229, 2013.

Leal, C. A., Tavares, G. C., & Figueiredo, H. C. Outbreaks and genetic diversity of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* isolated from farm-raised Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Brazil. *Genetics and molecular research : GMR*, v. 13, n.3, p. 5704–5712, 2014.

Lefébure, Robert. Effects of temperature and terrestrial carbon on fish growth and pelagic food web efficiency. Diss. Umeå Universitet, 2012.

Levit, S. M. A literature review of effects of ammonia on fish. The nature conservancy. Protecting nature. Preserving life. Nature. org, 2010.

Lin, Q., Li, N., Fu, X., Hu, Q., Chang, O., Liu, L., Zhang, D., Wang, G., San, G., Wu, S. An outbreak of granulomatous inflammation associated with *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in farmed tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) in China. *Journal of oceanology and limnology*, v. 34, p. 460–466, 2016.

Lin, Y., Miao, L. H., Pan, W. J., Huang, X., Deng, J. M., Zhang, W. X., Xi, B. W. Effect of nitrite exposure on the antioxidant enzymes and glutathione system in the liver of bighead carp, *Aristichthys nobilis*. *Fish & shellfish immunology*, v. 76, p. 126-132, 2018

Mallya, Y. J. The effects of dissolved oxygen on fish growth in aquaculture, Kingolwira National Fish Farm Center UNU-Fisheries Training Programme, 30 pp, 2007.

Martins, C. I., Pistrin, M. G., Ende, S. S., Eding, E. H., & Verreth, J. A. (2009). The accumulation of substances in Recirculating Aquaculture Systems (RAS) affects embryonic and larval development in common carp *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, v. 291, n. 1-2, p.65-73, 2009.

Mauel, M.J., Miller, D.I., Frazier, K., Liggett, A.D., Styer, L., Montgomery-Brock, D., Brock, J. Characterization of a piscirickettsiosis-like disease in Hawaiian tilapia. *Diseases of aquatical organisms*, v. 53, n. 3, p. 249-255, 2003.

Mirea E. T. Influence of different water temperature on intensive growth performance of Nile tilapia in a recirculation aquaculture system. Lorena Dediu University of agriculture science and veterinary medical vol. 60, 2013.

Mjoun, K., Rosentrater, K., Brown, M.L. Tilapia: environmental biology and nutritional requirements, 2010.

Nehemia, A., Maganira, J. D., Rumisha, C. Length-Weight relationship and condition factor of tilapia species grown in marine and fresh water ponds. Agriculture and Biology Journal of North America v. 3, n. 3, p.117-124, 2012.

Pereira, F. L., Tavares, G. C., de Carvalho, A. F., Rosa, J. C. C., Rezende, C. P., Leal, C. A. G., & Figueiredo, H. C. P. Effects of temperature changes in the transcriptional profile of the emerging fish pathogen *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*. Microbial pathogenesis, 133, 103548, 2019.

Pradeep, P. J., Suebsing, R., Sirithammajak, S., Kampeera, J., Turner, W., Jeffs, A., Withyachumanarnkul, B. Vertical transmission and concurrent infection of multiple bacterial pathogens in naturally infected red tilapia (*Oreochromis* spp.). Aquaculture research, v. 48, n. 6, p. 2706-2717, 2017.

Rebouças, V. T., Lima, F. R. D. S., & Cavalcante, D. D. H. Tolerance of Nile tilapia juveniles to highly acidic rearing water. Acta Scientiarum. Animal Sciences, v. 37, p. 227-233, 2015.

Rodrigues, A. P. O.; Lima, A. F.; Alves, A. L.; Rosa, D. K.; Torati, L. S.; Santos, V. R. V. dos. Piscicultura de Água Doce: multiplicando conhecimentos. EMBRAPA, c. 1, p. 50-51, 2013.

Rodrigues, M. V., Francisco, C. J., David, G. S., da Silva, R. J., Falcone-Dias, M. F., & Júnior, J. P. A. Monitoring of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Brazil. Aquaculture international, 26, 127-138, 2018.

Shahin, K., Gustavo Ramirez-Paredes, J., Harold, G., Lopez-Jimena, B., Adams, A., Weidmann, M. Development of a recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*. PLoS ONE v. 13, n. 2, e0192979, 2018.

Simões, M. R., Ribeiro, C. de F. A., Ribeiro, S. da C. A., Park, K. J., & Murr, F. E. X. Composição físico-química, microbiológica e rendimento do filé de tilápia tailandesa (*Oreochromis niloticus*). Food Science and Technology, v. 27, n. 3, p. 608–613, 2007.

Soto, E., Hawke, J.P., Fernandez, D. and A Morales, J. *Francisella* sp., an emerging pathogen of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in Costa Rica. Journal of Fish Diseases, v. 32: p. 713-722, 2009a.

Soto, E., Fernandez, D., Hawke, J. Attenuation of the fish pathogen *Francisella* sp. by mutation of the *iglC** gene. Journal of aquatic animal health, v. 21, n. 3, p. 140-149, 2009b.

Soto, E., Abrams S. B., Revan, F. Effects of temperature and salt concentration on *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* infections in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Diseases of aquatic organisms, v. 101, p. 217-223, 2012.

Souza, M. L. R. Comparação de Seis Métodos de Filetagem, em Relação ao Rendimento de Filé e de Subprodutos do Processamento da Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Revista Brasileira de Zootecnia., v. 31, n. 3, p. 1076-1084, 2002.

Stone, N. M., Thomforde, H. K. Understanding your fish pond water analysis report. Cooperative Extension program, Univ. of Arkansas at Pine Bluff Aquaculture/ Fisheries, 2004.

White, R. S., McHugh, P. A., Glover, C. N., & McIntosh, A. R. Multiple environmental stressors increase the realised niche breadth of a forest-dwelling fish. Ecography, v. 38, n. 2, p. 154-162, 2015.

Xavier, P. F. M., Filho, J. S. F., Júnior, M. A. G. P. IMPACTOS SOCIOECONÔMICOS DA AQUICULTURA NO BRASIL: ANÁLISE A PARTIR DA MATRIZ DE CONTABILIDADE SOCIAL. *Revista Econômica Do Nordeste*, 51(4), 159–176, 2021.

Zhang, J-M., Fu, B., Li, Y-C., Sun, J-H., Xie, J., Wang, G-J., Tian, J-J., Kaneko, G., Yu, E-M. The effect of nitrite and nitrate treatment on growth performance, nutritional composition and flavor-associated metabolites of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture*, v. 562, 2023.