



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA**

**LUCAS DANIEL BORGES**

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E ANÁLISE**  
**DA PESCA DE PEIXES ORNAMENTAIS RECIFAIS**

**FORTALEZA**

**2020**

LUCAS DANIEL BORGES

CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E ANÁLISE  
DA PESCA DE PEIXES ORNAMENTAIS RECIFAIS

Dissertação de Mestrado apresentada a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenheiro de Pesca. Área de Concentração: Recursos Pesqueiros e Meio Ambiente.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Francisca Gleire Rodrigues De Menezes.

Coorientador: Prof. Dr. Manuel Antônio de Andrade Furtado Neto.

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

B732c Borges, Lucas Daniel.

Caracterização microbiológica e análise da pesca de peixes ornamentais recifais / Lucas Daniel Borges. – 2020.  
77 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2020.

Orientação: Profa. Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes .

Coorientação: Prof. Dr. Manuel Antônio de Andrade Furtado Neto.

1. Aquarismo marinho. 2. Microbicidas. 3. Microbiostáticos. 4. Sustentabilidade. I. Título.

CDD 639.2

---

LUCAS DANIEL BORGES

CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E ANÁLISE  
DA PESCA DE PEIXES ORNAMENTAIS RECIFAIS

Dissertação de Mestrado apresentada a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Pesca. Área de Concentração: Recursos Pesqueiros e Meio Ambiente.

Aprovada em: \_\_\_\_\_ de fevereiro de 2020

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Francisca Gleire Rodrigues De Menezes (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Marina Teresa Torres Rodriguez  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Rossi Lelis Muniz Souza  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha mãe Tereza, minha irmã Raquel,  
minha avó Julita, minha avó Stela (in  
memoriam) e ao meu orientador “Manel”  
(in memoriam).

Sou o amor que me deram.

## AGRADECIMENTOS

A Deus que enche a minha vida com amor, paz e solidariedade. Que eu possa reconhecer o seu toque, sentir o seu abraço e ouvir a sua voz sempre.

À minha família, nas pessoas Julita (avó), Stela (avó), Raquel (irmã), Abner (cunhado) e Tereza (mãe), a luta de vocês é minha luta, minha vitória é vitória de vocês. A vitória que vence o medo. Que possa sempre dar orgulho e contribuir com o amor a mim dado.

Aos irmãos, sobrinho e mãe que ganhei da vida, Leonardo Freire, Leonardo Firmeza, Nara Freire, Mateus Freire e Ruth Freire, a sorte da minha família é ter gente como vocês perto.

À Julianne, só de viver esses momentos com você, a vida já tem outro significado. Que eu possa retribuir todo o amor, apoio e empatia.

Aos meus amigos, pessoas que fazem meu coração sorrir, especialmente a Hudson, Junior, Eliak, Ivis, Alisson, Pedro, Jessyca, Barbara, Gabriel, Vládila, Alexandra, João, Raquel, Robério, Tereza, Jhones, Jaqueline, Larissa e Juliana. O que importa não é o que eu tenho na vida, mas quem eu tenho na vida. Por isso, guardo todos vocês, pessoas importantes da minha vida, em meu coração.

A família LAMAP - Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado, na pessoa da Profa. Oscarina, que abriu as portas de sua casa para mim e tem o lindo costume de lutar por todos, Cristiane, que têm os melhores bordões e serviu de luz a tantos, Jessica Lucinda, a mulher que é apaixonada por requeijão e manteiga, Marina, que sabe fazer o melhor patê de pimentão do mundo, Anna, que me fez amar Mossoró. Nunca esquecerei toda ajuda, compreensão e carinho. Nunca esquecerei os ensinamentos. Eu sou eternamente grato pela oportunidade.

A comunidade da Praia de Redonda, Icapuí/CE, nas pessoas de Segundo e Eugênio, tive o privilégio de me sentir em casa em um lugar com pessoas de almas abertas e corações cantantes.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Manuel Antônio de Andrade Furtado Neto, que me mostrou o verdadeiro significado de “dar aula”, ser professor e de cativar alunos, dividindo e confiando a mim aquilo que ele sempre amou: ensinar. Minha dissertação tem o peso do seu passado. Tem o peso da sua alegria, como uma boa música que gostamos de repetir. Tem o peso dos seus conselhos e palavras ditas,

sempre rindo. Tem o peso das oportunidades que me deu e dos ensinamentos que me deixou. Pesa como pesa uma ausência. Pesa como pesa a lágrima que se chorou. Tem o imaterial peso da saudade e do amor. Sentirei saudade às segundas e quartas, mas para tanto, toda vez que eu ver a abreviatura de mestre e de doutor antes do meu nome eu lembrarei do senhor. Esta dissertação não é minha, é sua, fiz para você. Muito obrigado! Vá com Deus!

A minha orientadora e amiga, Profa. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes, obrigado por confiar na gente. Sou grato por ter ti conhecido e agradeço por você fazer parte desse momento. Uma das coisas mais belas da minha vida, você que me ensinou: não sou obrigado a vencer, mas tenho o dever de ser verdadeiro. Não sou obrigado a ter sucesso, mas tenho o dever de corresponder à luz que tenho. Nunca esperei ser alguém importante, mas o que quer que eu seja, o que quer que eu faça, serei e farei com todo o meu coração. E que o mínimo que a gente faça seja, a cada momento, o melhor que afinal se conseguiu fazer. Professora, tudo o que os meus sonhos precisavam para serem realizados é alguém que acreditasse que eles poderiam ser realizados. Eu e Manuel acreditamos que você foi nosso presente. Muito obrigado!

Ao PPGEP, nas pessoas de Dona Rogéria e Prof. Bartolomeu Warlene.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo durante o curso.

À todos aqueles que confiaram em minhas crenças, decisões e fé. Sou o resultado da confiança, amor e da força de cada um de vocês. Obrigado.

“Eu só queria que você soubesse que sempre terá uma parte de você em mim. E sou grato por isso.” (*Phoenix, J. em Her de Spike Jonze*)

## RESUMO

Aquariofilia ou aquarismo é a prática de criar peixes, invertebrados, plantas e outros organismos aquáticos em aquários ou tanques com finalidade de ornamentação. Os peixes ornamentais marinhos são amplamente criados globalmente, sendo exibidos em mais de dois milhões de aquários públicos em países do mundo todo. Em certas ocasiões, quando ocorre um manejo inadequado da pesca de peixes ornamentais para abastecer o mercado do aquarismo, tem sido observado um declínio na saúde dos ambientes e uma presença de estressores que agem sobre a fauna local propiciando o aparecimento de epizootias. O presente trabalho tem como objetivo geral caracterizar a microbiologia de peixes recifais e do ambiente posterior a pesca. Este trabalho reserva-se a concentrar seu foco em três gêneros bem descritos à importância do tema – *Vibrio*, *Aeromonas* e *Pseudomonas*. O presente trabalho observou diminuição gradual na população de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHC) no sistema de contenção dos animais pescados devido a falhas técnicas consideráveis observadas. Foram isoladas e identificadas bactérias dos gêneros *Vibrio*, *Aeromonas* e *Pseudomonas*, a partir de amostras do muco do pescado e água do sistema de contenção dos animais posterior a pesca. O teste de susceptibilidade a antimicrobianos mostrou que o gênero *Aeromonas* foi o que apresentou o maior número de cepas resistentes, 8% destas teve seu perfil de resistência enquadrado como MDR. O muco dos peixes analisados demonstrou que podem inibir a adesão ou o desenvolvimento de patógenos. A utilização de análises microbiológicas na pesca de peixes ornamentais permitiu mediar o processo de preservação da pesca em uma forma mais enriquecedora, motivando na conservação do recurso e contribuindo para o desenvolvimento de uma atividade econômica realmente significativa.

**Palavras-chave:** Aquarismo marinho. Microbicidas. Microbiostáticos. Sustentabilidade.

## ABSTRACT

Aquarism is the practice of creating fish, invertebrates, plants and other aquatic organisms in aquariums or ponds for ornamentation purposes. Marine ornamental fish species are widely bred globally, being displayed in more than two million public aquariums in countries around the world. On certain occasions, when there is an inadequate management of ornamental fish fishing to supply the aquarium market, there has been a decline in the health of the environments and the presence of stressors that act on the local fauna, causing the appearance of epizootic diseases. This work aims to characterize the microbiology of reef fish and the environment after fishing. This work reserves the focus on three genres well described to the importance of the theme - *Vibrio*, *Aeromonas* and *Pseudomonas*. The present study observed a gradual decrease in the population of Cultivable Heterotrophic Bacteria (BHC) in the containment system of the animals caught due to the considerable technical failures observed. Bacteria of the genera *Vibrio*, *Aeromonas* and *Pseudomonas* were isolated and identified, from samples of the fish's mucus and water from the animals' containment system after fishing. The antimicrobial susceptibility test showed that the genus *Aeromonas* was the one with the highest number of resistant strains, 8% of which had their resistance profile framed as MDR. The mucus of the analyzed fish demonstrated that it can inhibit the adhesion or the development of pathogens. The use of microbiological analyzes in the fishing of ornamental fish allowed to mediate the process of preservation of fishing in a more enriching way, motivating the conservation of the resource and contributing to the development of a really significant economic activity.

**Keywords:** Marine aquarism. Microbicides. Microbiostatic. Sustainability.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Mapa simplificado dos pontos de coleta de água e muco de peixes ornamentais da região litorânea de Icapuí/CE..... 28
- Figura 2 – Especime de *Pomacanthus paru*, peixe ornamental coletado para amostragem de coleta de muco na pesquisa microbiológica..... 29
- Figura 3 – Coleta de amostra de água em um sistema de contenção de peixes ornamentais pescados no litoral de Icapuí/CE..... 30
- Figura 4 – Fluxograma da avaliação microbiológica das amostras de muco de peixes ornamentais e água da cidade de Icapuí/CE..... 31
- Figura 5 – Fluxograma resumo das atividades da avaliação microbiológica das amostras até o isolamento das estirpes por gênero a estudar de muco de peixes ornamentais e água do sistema de recirculação da cidade de Icapuí/CE..... 32
- Figura 6 – Fluxograma da identificação presuntiva até a identificação definitiva das estirpes isoladas do muco de peixes ornamentais e água do sistema de recirculação da cidade de Icapuí/CE..... 33
- Figura 7 – Fluxograma da identificação definitiva dos isolados por gênero das cepas do muco de peixes ornamentais e água da cidade de Icapuí/CE..... 34
- Figura 8 – Teste de susceptibilidade à duas concentrações do agente O/129 (10 µg e 150 µg). A esquerda uma cepa mostrando ser sensível as duas concentrações, com subpopulação às duas concentrações. A direita cepa mostrando ser resistente às duas concentrações, resultado típico *Aeromonas* spp..... 36
- Figura 9 – A. Prova positiva para Indol em Ágar SIM; B. O tubo a esquerda, teste positivo para motilidade, com turvamento do meio. O tubo a direita mostra crescimento apenas no local de perfuração da agulha..... 37

Figura 10	– O tubo a esquerda mostra crescimento bacteriano com utilização do citrato do meio (coloração azul, positivo). O tubo a direita mostra crescimento bacteriano sem utilização do citrato no meio (coloração verde, negativo).....	38
Figura 11	– Tubos inoculados com cepas suspeitas de <i>Pseudomonas</i> spp. contendo ágar A de King, ou King P, as amostra positivas, apresentam coloração fluorescente na presença de luz ultravioleta, exaltando a presença de piocianina.....	39
Figura 12	– Tubos contendo ágar OF, as cepas 18 e 16, apresentando o tubo O com mudança de coloração e o tubo F sem alteração, demonstram prova positiva para <i>Pseudomonas</i> spp. não fermentadoras.....	41
Figura 13	– Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos. Cepas que apresentam halos frente a presença de discos de antimicrobianos demonstram inibição do crescimento microbiano.....	42
Figura 14	– Sistema de Recirculação de Água utilizado na contenção dos animais pescados no município de Icapuí/CE.....	48
Figura 15	– Utilização de sulfato de cobre (CuSO <sub>4</sub> ) e formaldeído (H <sub>2</sub> CO) no sistema de recirculação de água para peixes ornamentais no município de Icapuí/CE.....	49
Figura 16	– Exemplar juvenil da <i>Heteropriacanthus cruentatus</i> (Peixe 9) na medição do comprimento total do animal em estudo - cidade de Icapuí/CE.....	52

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Estimativa de contagem padrão em placas (CPP) de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHC) e linha tendência entre as coletas e suas respectivas amostragem..... 48
- Gráfico 2 – Porcentagem de bactérias dos gêneros Vibrio, Aeromonas e Pseudomonas somada a todas amostragens da microbiota - água e mucos, em estudo - cidade de Icapuí/CE..... 52
- Gráfico 3 – Percentual de susceptibilidade a diferentes antimicrobianos de 40 cepas de Vibrio spp. isoladas de água e muco de peixes ornamentais no litoral de Icapuí/CE..... 57
- Gráfico 4 – Percentual de susceptibilidade a diferentes antimicrobianos de 29 cepas de Aeromonas spp. isoladas de água e muco de peixes ornamentais no litoral de Icapuí/CE..... 59
- Gráfico 5 – Percentual de susceptibilidade a diferentes antimicrobianos de 3 cepas de Pseudomonas spp. isoladas de água e muco de peixes ornamentais no litoral de Icapuí/CE..... 60
- Gráfico 6 – Perfil de resistência, em percentual, de 25 cepas de Aeromonas spp. resistentes a pelo menos uma classe de antimicrobianos, isoladas de água e muco de peixes ornamentais no litoral de Icapuí/CE, 8% apresentaram multirresistência a diferentes antimicrobianos..... 61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Espécies de peixe ornamentais que foram analisados - cidade de Icapuí/CE.....	29
Tabela 2 – Estimativa de contagem padrão em placas (CPP) de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHC), Vibrio spp., Aeromonas spp. e Pseudomonas spp. nas amostras de água e muco de peixes ornamentais de Icapuí/CE.....	45
Tabela 3 – Zonas de Inibição em crescimento de Cepas testadas frente a Amostras de muco de peixes ornamentais da terceira coleta oriundos a cidade de Icapuí/CE.....	62

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	Objetivo geral.....	18
2.2	Objetivos específicos.....	18
3	EMBASAMENTO TEÓRICO.....	19
3.1	Peixes ornamentais.....	19
3.2	Meio ambiente e estressores.....	21
3.3	Doenças Bacterianas em peixes marinhos e Resistência.....	24
4	METODOLOGIA.....	28
4.1	Local de coleta.....	28
4.2	Características de Manejo do Sistema de Recirculação.....	30
4.3	Amostras analisadas.....	30
4.4	Preparo das amostras.....	31
4.5	Contagem e isolamento das estirpes.....	32
4.6	Identificação presuntiva.....	33
4.6.1	<i>Prova de Gram</i> .....	33
4.6.2	<i>Teste de citocromo-oxidase e Teste de catalase</i> .....	33
4.7	Identificação definitiva.....	34
4.7.1	<i>Identificação do gênero Vibrio pelo Manual de Bacteriologia Determinativa de Bergey</i> .....	35
4.7.2	<i>Identificação do gênero Aeromonas pela Aerokey II</i> .....	35
4.7.2.1	<i>Teste em Ágar Tríplice Açúcar e Ferro</i> .....	36
4.7.2.2	<i>Teste de resistência ao agente O/129</i> .....	36
4.7.3	<i>Identificação do gênero Pseudomonas por metodologia adaptada</i> ....	37
4.7.3.1	<i>Teste de produção de Indol e presença de motilidade</i> .....	37
4.7.3.2	<i>Teste da utilização de Citrato</i> .....	38
4.7.3.3	<i>Teste da presença de Piocianina</i> .....	39
4.7.2.4	<i>Teste de hidrolise da Esculina</i> .....	40
4.7.3.5	<i>Teste em ágar OF</i> .....	40
4.8	Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	41

4.9	Teste da camada dupla de ágar.....	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1	Desenvolvimento da atividade de aquarismo na região.....	44
5.2	Contagem e abundância de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHC), Vibrio, Aeromonas e Pseudomonas nas amostras de Icapuí/CE.....	45
5.2.1	<i>Ingerência do Sistema de Recirculação e Influência nas Contagens de Bactéria: situações de risco por manejo inadequado.....</i>	47
5.2.2	<i>Diversidade de Vibrio, Aeromonas e Pseudomonas de peixes ornamentais nas amostras de Icapuí/CE.....</i>	50
5.3	Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	54
5.4	Teste da camada dupla de ágar.....	60
6	CONCLUSÃO.....	64
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
	REFERÊNCIAS.....	66

## 1 INTRODUÇÃO

O aquarismo é a prática de criar peixes, invertebrados, plantas e outros organismos aquáticos em aquários ou tanques com finalidade de ornamentação. Esta prática denomina-se aquariofilia, distinguindo-se assim essa atividade da piscicultura (aquicultura), que têm aspectos de produção para fins de alimentação. A denominação "peixe ornamental" é designada a espécies de peixes que devido a sua exuberância em cores, formas e tamanhos são criados em cativeiro (ALDERTON, 2008).

Os peixes ornamentais marinhos são criados globalmente, sendo exibidos em mais de dois milhões de aquários públicos em países do mundo todo. Essa disseminação contribui para o aumento contínuo do setor de aquariofilia e propiciou a conscientização, valorização e existência dos ambientes recifais marinhos (NIJMAN, 2009; TEITELBAUM *et al.*, 2010).

Em certas ocasiões, quando ocorre um manejo inadequado da pesca de peixes ornamentais para abastecer o mercado do aquarismo, tem sido observado um declínio na saúde dos ambientes e uma presença de estressores que agem sobre a fauna local propiciando o aparecimento de epizootias (MARIBUS GGMBH, 2010).

Na prática do aquarismo, existe a possibilidade de transmissão de doenças dos peixes e corais do ambiente natural para os aquários, que em geral, são conhecidas apenas em publicações não convencionais e não comerciais - literatura "cinzenta". Ainda não foram sistematicamente descritas a relação dessas doenças com os vários aspectos ambientais, sendo, portanto, difícil de determinar causas e efeitos (SWEET; JONES; BYTHELL, 2011).

Sabe-se que o mercado de peixes ornamentais representa hoje um setor em crescimento do comércio internacional de peixes, no qual o Brasil tem destaque, devido a crescente popularidade de aquários residenciais. O mercado ornamental é uma importante fonte de renda para comunidades rurais, costeiras e insulares em países em desenvolvimento, oferecendo oportunidades de emprego e renda para populações desses países (OLIVIER, 2013).

Ao mesmo tempo, as questões de sustentabilidade das práticas de pesca e aquicultura tem se tornado relevante tanto para os peixes ornamentais quanto para os peixes de corte, como demonstrou a Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Fauna e da Flora Selvagens Ameaçadas de Extinção (CITES, 2002).

A crescente demanda por peixes ornamentais determina ao setor de aquariofilia uma grande responsabilidade perante a manutenção deste recurso. Desta forma, para desenvolver acertadamente tal atividade tem sido necessário descrever atividades triviais, de porte secundário, que na maioria das vezes não são bem descritas (MOE, 2003).

Os fatores que determinam a compreensão microbiológica da captura de animais ornamentais na natureza são pouco conhecidos. Seja na determinação dos patógenos que ocorrem nos animais, tanto na natureza como em cativeiro, seja na avaliação dos procedimentos e técnicas que melhor adaptam a pesca na falta de conhecimento técnico para a resolução de problemas com doenças, ou na aplicação de uma pesca sustentável com desenvolvimento de protocolos de sanitização (AUSTIN, 2006a).

A relação dessas doenças com os vários aspectos ambientais e até mesmo a pesca destes animais é difícil de ser determinada. Provavelmente, o conhecimento técnico microbiológico da atividade, a identificação de prováveis grupos patogênicos e as resistências destes perante antimicrobianos, pode servir como meio influenciador para o desenvolvimento de uma atividade mais sustentável. A microbiologia do ambiente e de peixes ornamentais pode ser determinante como instrumento para identificar os riscos da pesca não sustentável (SWEET; JONES; BYTHELL, 2011).

É possível que frente a essas características a inserção de estressores ambientais possa modificar de forma negativa a pesca. É importante salientar que a inserção de uma atividade pesqueira sem a qualidade microbiológica dos animais capturados pela pesca de ornamentais, pode afetar a sustentabilidade da pesca que pratica manejos equivocados, resultando em prejudicar as relações microbiológicas do ambiente e dos animais (MARIBUS GGMBH, 2010).

Tomando em conta o anteriormente citado, este trabalho visa caracterizar a microbiota do muco e do ambiente de peixes marinhos ornamentais capturados.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo geral caracterizar de forma microbiológica o muco de peixes ornamentais e a água do sistema de contenção dos animais posterior a captura.

### 2.2 Objetivos específicos

- Quantificar Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHC) do muco e da água do sistema de contenção dos animais posterior a captura.
- Isolar e identificar bactérias dos gêneros *Vibrio*, *Aeromonas* e *Pseudomonas*, em muco e ambiente de contenção.
- Determinar a susceptibilidade a antimicrobianos de uso veterinário das estirpes alvo de estudo.
- Detectar situações de risco por manejo inadequado na atividade de aquarismo estudada.

### 3 EMBASAMENTO TEÓRICO

#### 3.1 Peixes ornamentais

O termo “peixes ornamentais” é uma definição dada para espécies que são selecionadas pela exuberância das suas cores e formas e pela facilidade de manutenção em cativeiro. Os peixes ornamentais marinhos correspondem a um total aproximado de 1.471 espécies comercializadas globalmente cuja melhor estimativa gira em torno de 20 a 24 milhões de indivíduos comercializados anualmente (WABNITZ *et al.*, 2003).

Segundo Castro e Huber (2012), peixes ornamentais são animais vertebrados (subfilo *Vertebrata*) que apresentam corpo com simetria bilateral, dotados de uma espinha dorsal protetora de um cordão nervoso, e presença de um endoesqueleto. É atribuído a estes animais venustidade ou encanto decorrentes do formato do corpo ou da coloração, esta última, dada aos pigmentos coloridos encontrados em células especiais na pele, denominadas de cromatóforos. Há grande variedade de cores e matizes observados entre os peixes marinhos, sendo que esta característica é resultado da combinação de cromatóforos com quantidades variadas de diferentes pigmentos.

Para Moe (2003, p. 11), peixes ornamentais fomentam o hobby do aquarismo e as indústrias associadas a coleta de organismos ornamentais marinhos, a cultura em cativeiro, a manufatura de produtos de aquário, distribuição e comércio:

“os peixes ornamentais permitem a capacidade de desenvolvimento de pescadores amadores e pequenas empresas de propagação em cativeiro para manter e cultivar corais vivos em sistemas de aquários marinhos. O crescimento deste hobby/indústria na manutenção de corais também estimulou a coleta e propagação de outros organismos do aquário, como peixes, rochas vivas, areia viva e uma grande variedade de animais invertebrados”.

A exploração de peixes ornamentais é aplicada em locais onde há a pesca deste recurso. Evidentemente a aplicação pode ser utilizada para fortes preocupações ambientais em relação à sustentabilidade dos estoques selvagens de organismos coletados que também se desenvolveram à medida que a coleta e o comércio de

animais vivos marinhos se expandiram, bem como os estresses ambientais e antropogênicos (MOE, 2003).

Na Ásia e Oceania, pequenos negócios de cultura comercial estão sendo desenvolvidos em áreas que apresentam riqueza em biodiversidade e alto grau de simbiose (MOE, 2003).

A crescente valorização do mercado ornamental tem provocado preocupação no âmbito ambiental e aumento de restrições à coleta de estoques selvagens, incentivando à aquicultura de peixes ornamentais marinhos, estimulando o interesse e os esforços na preservação destes ambientes por criadores comerciais, aquários públicos, cientistas e hobbistas (MARIBUS GGMBH, 2010).

A indústria do aquarismo, como um todo, tem um volume relativamente baixo mas um valor muito alto (BALBOA, 2003; OLIVIER, 2003), fornecendo um incentivo para a conservação de habitats de recife e oferecendo um meio de subsistência às comunidades costeiras que vivem frequentemente em áreas de baixa renda (BUNTING, HOLTHUS e SPALDING, 2003).

Em 2000, 1 kg de peixe de aquário das Maldivas estava avaliado em quase US\$500, enquanto 1 kg de peixe pescado para alimentação valia apenas US\$6 (WABNITZ *et al.*, 2003).

Ainda para Moe (2003, p. 11):

“O crescimento acelerado da compreensão biológica e a tecnologia que esse conhecimento gerou estão rapidamente mudando a estrutura social e econômica do hobby. É importante conhecer os interesses, os esforços, os sucessos, os fracassos e as atitudes de todos os envolvidos nessas buscas para compreender o presente e planejar o futuro do hobby e da indústria da vida marinha ornamental. Nesse sentido, peixes ornamentais permitem uma pesca de alto valor agregado, bem como, preservação e aumento do conhecimento do ambiente dele pertencente.”

Desta forma, é importante compreender que a sociedade deve mudar seu comportamento e compreensão sobre a pesca de peixes ornamentais com o objetivo de alcançar uma interação sustentável com o meio ambiente e a indústria em particular. Nesse sentido, peixes ornamentais tem que ser reconhecidos como um grupo de organismos aquáticos de notável beleza (CASTRO; HUBER, 2012).

Estes organismos desempenham um grande papel ambiental no habitat a qual pertencem, além de beneficiar as pessoas da comunidade no entorno que usufruem da pesca como atividade remunerada (MOE, 2003).

### **3.2 Meio ambiente e estressores**

Os ambientes recifais cobrem 0,25% do ambiente marinho, sendo considerados os ecossistemas mais biologicamente ricos e produtivos na Terra (BUNTING; HOLTHUS; SPALDING, 2003), e frequentemente descritos como a “floresta tropical dos mares” (MCALLISTER, 1995; SPALDING; GREEN; RAVILIOUS, 2001).

Estes ambientes incrivelmente diversos proporcionam uma ampla gama de benefícios diretos e indiretos a milhões de pessoas e estima-se que sejam cerca de 375 bilhões de dólares por ano. Incluindo obtenção de fontes de proteína para alimentação, turismo, bem como funções menos óbvias, como proteção contra erosão (COSTANZA *et al.*, 1997).

Ambientes recifais são fundamentalmente bem adaptados às variações naturais nas condições ambientais. Eles podem tolerar situações extremas por um tempo limitado. Mas o clima em constante mudança e as ações antropogênicas estão alterando alguns habitats tão severamente que o estresse - pressões provocadas por mudanças em suas condições de habitat, se torna grande demais para as plantas, as algas, os animais marinhos e ao próprio recife. Quando vários fatores desfavoráveis se combinam, levando ao “estresse múltiplo”, o efeito cumulativo pode causar de doenças até mesmo a extinção de alguma espécie (BAKER *et al.*, 2004; HUGHES *et al.*, 2003; MARIBUS GGMBH, 2010).

As mudanças climáticas muitas vezes introduzem vários estressores ao mesmo tempo. Em uma determinada localização e hora, a temperatura, a disponibilidade de luz e pH podem variar deixando o ambiente desfavorável para alguns organismos. Com certa frequência, os manejos pesqueiros mal introduzidos também podem agir como estressores, propiciando diversos efeitos adversos diretos e indiretos - como facilitador da presença de predadores, diminuição da alimentação em teias ecológicas, assim como, a presença de organismos patogênicos e epizootias (HOEGH-GULDBERG *et al.*, 2007; MARIBUS GGMBH, 2010).

Um interesse importante e crescente nos recifes de corais deve-se simplesmente à vasta diversidade biológica que eles suportam - muito do que ainda não é conhecido (SEBENS, 1994). Para Bunting, Holthus e Spalding (2003, p. 110) ambientes recifais são de extremas importância para as pessoas pelas seguintes razões:

“Ambientes recifais permitem oferecer uma ampla gama de serviços extremamente valiosos para os seres humanos, especialmente para uso turístico e recreativo. O turismo é o maior e mais rápido setor de crescimento da economia global e é amplamente focado no litoral, frequentemente em áreas de recifes de corais. Cada vez mais, os viajantes das costas tropicais aventuram-se na água para o mergulho e pesca recreativa - tudo isso multiplicando os benefícios do turismo nos recifes de corais. Por exemplo, o trecho de recifes de 220 milhões de milhas da Flórida gera US \$ 1 bilhão em receitas anuais de pesca e turismo (LEE, 1996)”.

Os recifes podem apresentar aplicação na pesca comercial não consuntiva, como organismos capturados para o comércio de aquários marinhos. Sabe-se que a coleta e a exportação de plantas e animais ornamentais marinhas, quando feitas de forma responsável, trazem numerosos benefícios e evidentemente estas aplicações podem ser utilizadas cada vez mais por pessoas ao redor do mundo que estão reconhecendo esses vários benefícios dos corais (BUNTING; HOLTHUS; SPALDING, 2003).

Ao mesmo tempo, os recifes de corais estão recebendo atenção considerável porque estão sendo destruídos a uma taxa preocupante por uma variedade de impactos. Os seres humanos são os agentes impactantes/estressores cada vez mais presentes nos ambientes recifais, porque a concentração humana está progressivamente crescente nas zonas costeiras (COHEN *et al.*, 1997).

O uso crescente dos oceanos como consequência do aumento da população costeira, está provocando uma série de impactos nos recifes de corais. Desde a década de 1990, existem esforços para aumentar a visão global do estado desses ambientes. No estudo de Bryant *et al.* (1998), intitulada “Recifes em Risco”, ressaltam o grave estado dos ambientes recifais no mundo: dos 400 parques e reservas marinhas existentes, cerca de 40% têm menos de 1 km<sup>2</sup> de extensão, 40 países não possuem áreas marinhas protegidas e 11% dos recifes no mundo possuem sua biodiversidade em peixes sob alta ameaça de atividade humana.

Ainda para Bunting, Holthus e Spalding (2003, p. 111):

“58% dos ambientes recifais no mundo são potencialmente ameaçados pela atividade humana - desde o desenvolvimento costeiro, práticas de pesca destrutivas, exploração excessiva de recursos, a poluição marinha e o escoamento do desmatamento interno da agricultura. Nesse sentido, em ambientes recifais é difícil a identificação das causas exatas dos graves declínios nesses ambientes, estes ocorrem em todo o mundo. A degradação frequentemente ocorre por meio de uma combinação de fatores causados pelos seres humanos que deixam os recifes menos resistentes a distúrbios naturais periódicos, como chuvas intensas, assoreamentos, inserção de um patógeno e outros eventos. Os recifes saudáveis são resilientes e se recuperam com o tempo. Recifes prejudicados pela atividade humana podem ser mais vulneráveis requisitando de mais tempo para recuperação (BRYANT, BURKE, *et al.*, 1998).”

É importante compreender que a pesca é provavelmente o uso humano mais nocivo e difundido nos recifes, afetando até mesmo áreas remotas, ausentes dos impactos das atividades humanas baseadas em exploração. A pesca tem um impacto negativo nos recifes costeiros quando inclui a sobrepesca ou o uso de métodos destrutivos de colheita (BUNTING; HOLTHUS; SPALDING, 2003).

Quando a sobrepesca ocorre, pode resultar em mudanças no tamanho dos peixes, na abundância da população, e na composição de espécies dentro das comunidades de recifes. Um exemplo deste fato, é a remoção de espécies-chave de peixes que, em última análise, cria mudanças nos níveis ecológicos do ecossistema (ROBERTS, 1995). Ainda como exemplo, décadas de pesca excessiva no Caribe reduziram o número de peixes que se alimentam de algas. Sem peixes pastando, as algas rapidamente dominaram os recifes, inibindo a colonização de corais e às vezes superando os corais vivos.

Igualmente, vários métodos de pesca em recifes de coral são inerentemente destrutivos. Estes incluem a pesca com dinamite, cianeto ou utilização de agentes químicos que sustentam a atividade como antimicrobianos ou sanitizantes. Como os métodos destrutivos são geralmente não seletivos, há captura de muitas espécies não alvo, por sua vez, a comunidade microbiana pode sofrer perdas consideráveis juntamente com espécies alvo capturadas, podendo sofrer com a sobreposição de espécies (HIBBING *et al.*, 2010) ou adquirir alta resistência à tratamentos convencionais sanitizantes.

Nesse sentido, a suposição geral é que a indústria de aquários marinhos e os agentes de conservação de recifes estão em conflito um com o outro. A suposição se desenvolve basicamente em torno de três questões: a mortalidade em excesso após a pesca, a possibilidade de sobrepesca em algumas áreas e o uso de manejos de pesca e conservação destrutivos/danosos (BRYANT *et al.*, 1998).

A falta de conhecimento técnico e a deficiência em informações sobre o tema geralmente dificultam a aplicação de operações sustentáveis da indústria de aquários e o papel do comércio de aquários marinhos na manutenção da saúde microbiológica dos recifes, além da criação de benefícios socioeconômicos em áreas de arrecifes (BUNTING; HOLTHUS; SPALDING, 2003).

Levando em consideração a falta de conhecimento técnico e carência de informação, são necessários estudos que destaquem os impactos negativos e positivos da indústria de aquarismo marinho.

### **3.3 Patógenos bacterianos em peixes marinhos e Resistência a químicos e antimicrobianos**

O conhecimento sobre a microbiologia marinha despertou o interesse dos cientistas na década de 1970 quando foi considerada como um dos grandes avanços da ciência moderna. A essência disso decorre do descobrimento, em abundância, do picoplâncton, denominados como os menores organismos do plâncton, com dimensões inferiores a 2  $\mu\text{m}$ , como as bactérias (MUNN, 2011). Grande parte da biodiversidade, abundância e metabolismo marinho é de responsabilidade desses indivíduos (CASTRO; HUBER, 2012).

Os métodos modernos levaram a novas ideias sobre a evolução da vida microbiana (AUSTIN, 1988). Segundo Munn (2011), os microrganismos existem em grande número e formam um componente importante de biomassa na Terra, e esta possui uma ampla gama de condições físicas e químicas que fornece diversos habitats especializados, à exemplo dos oceanos.

O mar como ambiente, sempre colocou muitas dúvidas de extremo interesse para a microbiologia (SCHOLES; SHEWAN, 1964), sendo que grandes trabalhos sobre esses problemas já foram produzidos e publicados e, sem dúvida, ainda se produzirão muitos dados de pesquisas científicas nesta área. É importante salientar que a história da microbiologia dos mares não poderia estar completa sem o

conhecimento das doenças, ocasionadas por microrganismos, em especial por bactérias.

Doenças bacterianas em peixes causam grandes perdas na aquicultura (LOWRY; SMITH, 2006; MOHAMAD; ROSELI *et al.*, 2019; NURLIYANA *et al.*, 2019), mas os efeitos dos microrganismos sobre as populações na natureza são mais difíceis de determinar (BREITBART *et al.*, 2007; EILER; JOHANSSON; BERTILSSON, 2006). Bactérias produzem infecções em peixes usando uma série de mecanismos patogênicos (HANSEN; OLAFSEN, 1999; OLAFSEN, 2001; RINGØ *et al.*, 2010).

Para Munn (2005) patógenos são agentes biológicos que causam doenças, tendo como principais questões a serem abordadas: a ecologia natural desses organismos e os fatores que determinam sua capacidade de produzir males. A importância dos estudos das enfermidades bacterianas aos peixes marinhos deve-se ao fato de existir um aumento progressivo no número de novas taxas associadas ao aparecimento de patologias de peixes nos últimos 20 anos (AUSTIN; AUSTIN, 2012).

São exemplos consistentes desse pensamento, *Pasteurella skyensis*, que foi isolada com frequência de salmão do Atlântico cultivado em cativeiro que causou incidentes durante um período de quatro anos; *Francisella noatunensis*, responsável por infecções graves no cultivo de bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) (BAKKEMOA *et al.*, 2011) e o surgimento de doenças pelos chamados não cultiváveis, *Candidatus*, conceito usado para células intactas as quais foram observadas em tecido do organismo doente, porém não cultivados.

Austin, define a importância do estudo das doenças em peixes, utilizando a seguinte razão:

No geral, o estudo das doenças dos peixes concentrou-se nos problemas da aquicultura, em vez de nas populações de peixes selvagens. No entanto, está se tornando cada vez mais aparente que a doença não é necessariamente causada por espécies únicas, mas pode envolver interações sinérgicas entre dois ou mais variáveis. O isolamento de um organismo de peixes clinicamente doentes não implica necessariamente que estes tenham causado infecção. De fato, muitas vezes os postulados de Koch são convenientemente esquecidos (AUSTIN, 2006a, p. 391).

As bactérias constituem-se como patógenos oportunistas, colonizando e causando doenças em peixes com o sistema imune debilitado. Ressalta-se não apenas a grande variedade de patogenias bacterianas, mas também a resistência a

tratamentos antimicrobianos adquirida por esses patógenos pelos manejos de captura (AUSTIN; AUSTIN, 2012).

Igualmente, os gêneros *Vibrio* e *Pseudomonas* são citados como agentes que causam doenças em peixes ornamentais (em até 70% dos casos). Os *Víbrios* (exemplo, *Vibrio anguillarum*, *V. harveyi* e *V. alginolyticus*), ocasionam grandes problemas para os peixes com ênfase na aquicultura e na pesca em águas marinhas, costeiras e estuarinas. As estirpes bacterianas do gênero *Pseudomonas* patogênicas de peixes incluem *Pseudomonas anguilliseptica*, *P. baetica*, *P. chlororaphis*, que causam hemorragia na superfície do corpo, necrose da nadadeira caudal podendo chegar a um quadro de septicemia hemorrágica (AUSTIN; AUSTIN, 2012).

O gênero *Aeromonas* têm sido tradicionalmente referenciado como patógeno de peixes ornamentais. Janda e Abbott (2010), descrevem o gênero como foco de atenção desde o início do século XXI, particularmente como um alvo para o desenvolvimento de estratégias de diagnóstico e controle. Os autores associaram grandes perdas econômicas durante a última década com as perdas por mortalidade em peixes ocasionadas por bactérias pertencentes a esse gênero.

As doenças bacterianas têm sido consideradas como o problema infeccioso mais comum dos peixes ornamentais, e a maioria das infecções bacterianas são causados por organismos gram-negativos (AUSTIN; AUSTIN, 2012). A maioria dos patógenos bacterianos de peixes são habitantes naturais do ambiente aquático, seja ele de água doce ou marinha (MUNN, 2005), não sendo difícil relacionar que estressores extrínsecos, incluindo transporte marítimo, pesca, má qualidade da água, tratamentos antimicrobianos e nutrição inadequada, podem predispor um peixe ornamental a uma doença bacteriana e ocasionar resistência a tratamentos da mesma.

A utilização sem controle dos agentes químicos e antimicrobianos no tratamento de doenças bacterianas em ambientes mantém um risco microbiológico considerável. Hasman *et al.* (2006) demonstraram em estudo a resistência ao cobre, na forma de sulfato de cobre em colônias de *Enterococcus faecium* em suínos. Spicher e Peters (1976) verificaram a resistência de diferentes microrganismos ao formaldeído, destacando as diferentes colônias de *Pseudomonas aeruginosa*.

Se tratando de antimicrobianos, isolados ambientais de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*, identificados como patógenos de peixes marinhos, apresentaram o mesmo perfil de resistência aos antibióticos ampicilina,

penicilina e tetraciclina, independentemente dos países (ELMAHDI; DASILVA; PARVEEN, 2016). Drenkard (2003), caracterizou a resistência a agentes antimicrobianos de bactérias formadoras de biofilme, à exemplo de *Pseudomonas*, como importantes e persistentes bactérias.

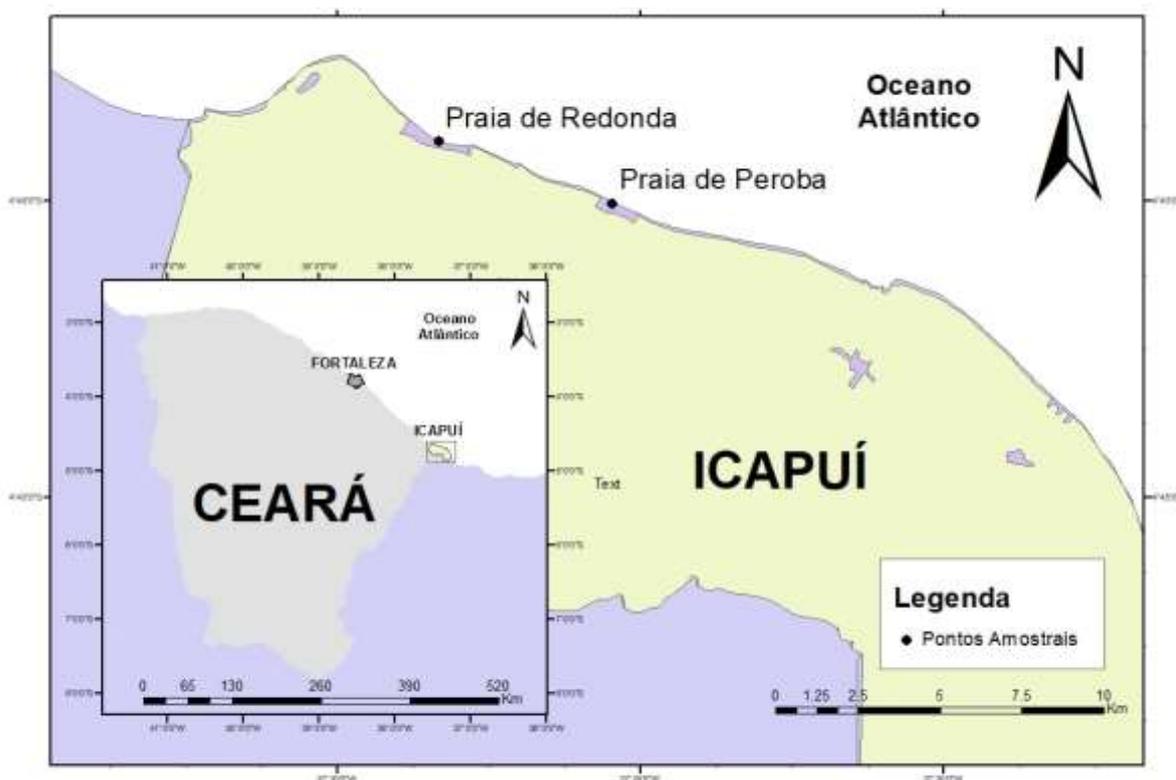
## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Local de coleta

A atividade de pesca de peixes ornamentais alvo do presente estudo acontece em um ambiente dotado de formação recifal (Figura 1), localizado nas Praias de Redonda e Peroba, município de Icapuí, na costa leste do Estado do Ceará. Os peixes ornamentais foram capturados acerca de trezentos metros da praia, em uma área estimada de 25 km<sup>2</sup>, preferencialmente em períodos com pouco vento e de baixa-mar.

As coletas foram realizadas durante os meses de julho a setembro do ano de 2019. Foram coletadas, amostras de muco dos animais e água no sistema de contenção dos animais posterior a pesca.

**Figura 1:** Mapa simplificado dos pontos de coleta de água e muco de peixes ornamentais da região litorânea de Icapuí/CE.



Fonte: elaborada pelo autor.

Nas coletas, observou-se o aparecimento de cinco espécies de peixe, o total de nove peixes analisados, que tiveram seu muco estudado: *Chaetodon striatus*; *Haemulon parra*; *Chaetodon striatus*; *Heteropriacanthus cruentatus* e *Pomacanthus paru* (Figura 2), este último de maior frequência de observação – girando em torno de 44,4% e estando presente em todas as coletas (Tabela 1).

**Figura 2:** Especime de *Pomacanthus paru*, peixe ornamental coletado para amostragem de coleta de muco na pesquisa microbiológica.



Fonte: elaborada pelo autor.

**Tabela 1:** Espécies de peixe ornamentais que foram analisados - cidade de Icapuí/CE.

Nome Popular	Nome Científico	Quantidade Coletada	Amostra (Peixe)
Peixe-borboleta	<i>Chaetodon striatus</i>	2	2 e 6
Paru-preto	<i>Pomacanthus paru</i>	4	1, 5, 7 e 8
Pirambu	<i>Haemulon parra</i>	1	3
Parum Branco	<i>Chaetodipterus faber</i>	1	4
Vermelho Zoião	<i>Heteropriacanthus cruentatus</i>	1	9

Fonte: dados da pesquisa.

O local de captura é dotado de formação rochosa, visível mesmo em período de preia-mar, fazendo assim, com que os pescadores tenham acesso fácil a captura. A pesca ocorre por meio de mergulho e com auxílio de pulça, iscas e atrativos. Este refúgio é visivelmente diverso em abundância e número de espécies, o que facilita a captura.

#### 4.2 Características de Manejo do Sistema de Recirculação

Foi realizada uma análise descritiva/explicativa das condições de manejo no local e atividade analisados. Também foram comparados os conhecimentos adquiridos através da consulta da literatura internacional e as Normas Técnicas existentes.

#### 4.3 Amostras analisadas

Cada coleta consistiu em um pool de amostras de água – filtração em três pontos do sistema do volume de um litro (Figura 3), e três amostras de muco de três animais, perfazendo no final dos meses de amostragem um total de 12 amostras, sendo 3 de água e 9 de muco.

**Figura 3:** Coleta de amostra de água em um sistema de contenção de peixes ornamentais pescados no litoral de Icapuí/CE



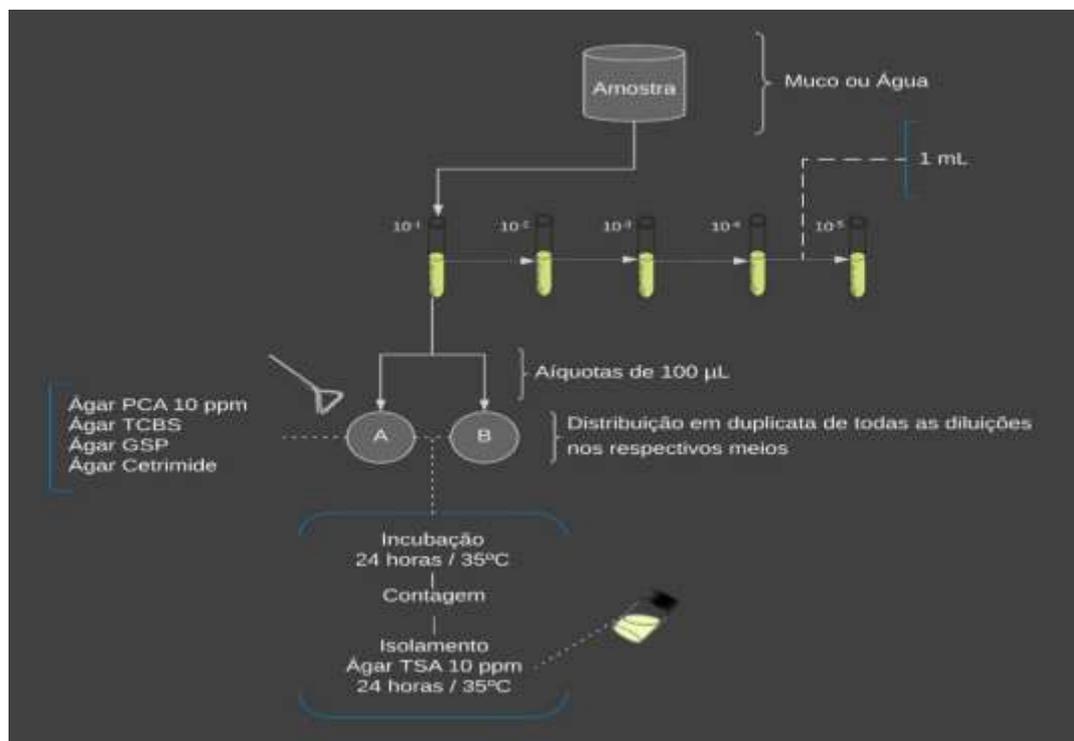
Fonte: elaborada pelo autor.

As amostras foram transportadas em caixas isotérmicas, até o laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) – UFC, onde foram processadas, imediatamente sendo estas avaliadas para análises microbiológicas quantitativa e com a utilização de antibiograma, analisando qualitativamente a resistência de cepas a antimicrobianos.

#### 4.4 Preparo das amostras

Para a determinação quantitativa, a partir das amostras de água e de muco foram preparadas diluições decimais sucessivas ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) em água do mar 20 ppm (Figura 4).

**Figura 4:** Fluxograma da avaliação microbiológica das amostras de muco de peixes ornamentais e água da cidade de Icapuí/CE.



Fonte: elaborada pelo autor.

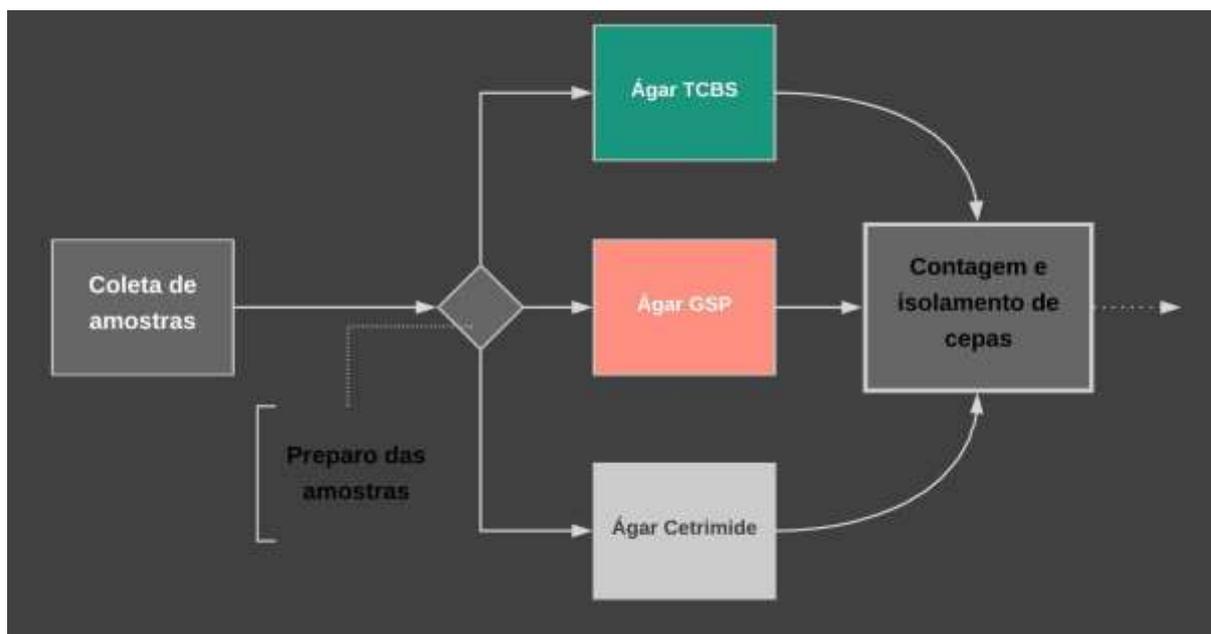
De cada diluição foram tomadas alíquotas de 100 µL (0,1 mL) e foram distribuídas em duplicata com auxílio de alças de Drigalski pelo método de semeadura por espalhamento (Spread Plate) em meio não seletivo (Ágar PCA 10 ppm de Água

do Mar, do Inglês, Plate Count Agar). Meios seletivos foram utilizados para o isolamento e identificação dos diferentes gêneros a avaliar: Ágar tiosulfato-citrato-sais biliares-sacarose (Ágar TCBS, meio seletivo para *Vibrio*), Ágar Gelatina Fosfato Sal (Ágar GSP inserido 20µg/mL de ampicilina, meio seletivo para *Aeromonas*) e Ágar Cetrimide (meio seletivo para *Pseudomonas*), em placas de petri. As placas foram então incubadas invertidas em estufa, onde permaneciam a 35°C por 24h, permanecendo as placas de Ágar Cetrimide e GSP por até 120 horas para sua leitura final.

#### 4.5 Contagem e isolamento das estirpes

Após o período de incubação, as colônias crescidas nas placas contendo um número entre 25 e 250 foram contadas através do método de Contagem Padrão em Placas (CPP) (DOWNES; ITO, 2001). Transcorrida a contagem, foram isoladas 10 colônias típicas dos gêneros alvo (Figura 5).

**Figura 5:** Fluxograma resumo das atividades da avaliação microbiológica das amostras até o isolamento das estirpes por gênero a estudar de muco de peixes ornamentais e água do sistema de recirculação da cidade de Icapuí/CE.



Fonte: elaborada pelo autor.

As colônias suspeitas foram então semeadas em tubos contendo Agar Tripticase Soja (Agar TSA em água do mar 10 ppm) inclinado, seguido de incubação

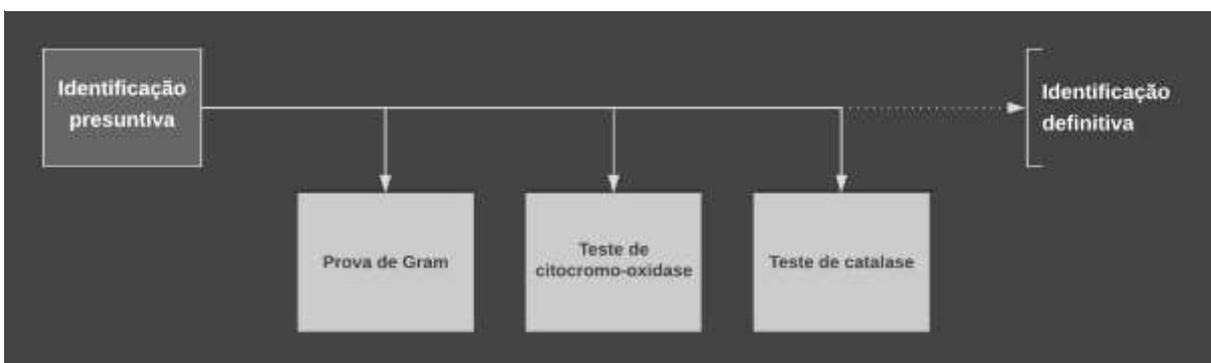
a 35°C por 24 h. Decorrido esse período, as culturas em ágar TSA foram armazenadas para posterior identificação presuntiva para gênero e susceptibilidade à antimicrobianos.

## 4.6 Identificação presuntiva

### 4.6.1 Prova de Gram

A prova de Gram foi utilizada para verificar as características morfológicas e tintoriais das cepas isoladas. Os esfregaços corados pelo método de Gram, foram preparados a partir de culturas em TSA 24 horas, contendo 10 ppm de água no mar. As cepas que apresentassem morfologia de bastonetes curtos à médios, curvados ou não, Gram-negativos, características de cepas de *Vibrio*, *Aeromonas* e *Pseudomonas*, foram levadas para as etapas posteriores da identificação presuntiva (Figura 6).

**Figura 6:** Fluxograma da identificação presuntiva até a identificação definitiva das estirpes isoladas do muco de peixes ornamentais e água do sistema de recirculação da cidade de Icapuí/CE.



Fonte: elaborada pelo autor.

### 4.6.2 Teste de citocromo-oxidase e Teste de catalase

Uma pequena porção do crescimento de cepas em culturas puras em ágar TSA 10 ppm foi transferida, por meio de uma alça de platina, para uma fita de oxidase. Logo a seguir, foram realizadas as leituras. As famílias Vibrionaceae, Aeromonadaceae e Pseudomonadaceae apresentam como característica ao teste, o

aparecimento da cor violeta na fita de oxidase, produto da presença da enzima citocromo-oxidase, sendo considerada uma resposta positiva. Salienta-se que algumas cepas podem apresentar oxidase negativa e ainda assim pertencer as respectivas famílias, por exemplo, o gênero *Vibrio* apresentando as espécies *Vibrio metschnikovii*, *V. aerogeneses* e *V. gazogenes* como oxidase negativa.

Igualmente para catalase, com o auxílio de uma alça de níquel-cromo, uma pequena amostra de crescimento puro era transferida para uma lâmina de vidro estéril. Em seguida, a cultura era coberta com uma gota de água oxigenada a 3,0%. A prova positiva era revelada através da liberação de bolhas.

#### **4.7 Identificação definitiva**

As cepas suspeitas de serem *Vibrio*, *Aeromonas* e *Pseudomonas* foram inoculadas em tubos com ágar TSA 10 ppm de água do mar incubados a 35°C por 24 h, sendo posteriormente realizado as provas de identificação (Figura 7).

**Figura 7:** Fluxograma da identificação definitiva dos isolados por gênero das cepas do muco de peixes ornamentais e água da cidade de Icapuí/CE.



Fonte: elaborada pelo autor.

O teste ágar TSI e provas complementares foram utilizados para reconhecer cepas de *Vibrio* - seguindo o Manual de Bacteriologia Determinativa de Bergey. Igual teste de fermentação e O/129, foram utilizados para diferenciação de cepas *Aeromonas* - a caracterização das espécies foi realizada pela chave de identificação Aerokey II (CARNAHAN; BEHRAM; JOSEPH, 1991), e testes de Indol, motilidade, esculina, citrato, King P e OF para identificação de *Pseudomonas* – adaptado de CETESB (2011) e Murray, Breed e Smith (1957).

#### **4.7.1 Identificação do gênero *Vibrio* pelo Manual de Bacteriologia Determinativa de Bergey**

A identificação de cepas suspeitas de serem do gênero *Vibrio* não ocorreu da mesma forma aos outros gêneros, isso devido ao fato do ágar TCBS ser um meio

de diferenciação seletiva para o isolamento de cepas de *Vibrio cholerae* e *V. parahaemolyticus*, além de outras espécies do gênero.

Para complementação na identificação na seleção das cepas de *Vibrio*, foi utilizada metodologia proposta por Murray, Breed e Smith (1957) - Manual de Bacteriologia Determinativa de Bergey: teste considerado positivo para presença da enzima citocromo oxidase e reação ácida para culturas em ágar TSI, fermentação da glicose (melhor descrito em “4.6.1. Identificação do gênero *Aeromonas* pela Aerokey II”, do presente trabalho).

#### **4.7.2 Identificação do gênero *Aeromonas* pela Aerokey II**

A caracterização dos isolados de *Aeromonas* spp. foi realizada utilizando-se a chave de classificação Aerokey II de 1991. Para a identificação do gênero *Aeromonas*, realizou-se a coloração de Gram e as culturas que apresentavam formato de bastonete curto, gram-negativa foram posteriormente testadas quanto a fermentação em Ágar Tríplice-Açúcar-Ferro (TSI) e susceptibilidade ao agente vibrioestático O/129 (CAMPBELL; FARRELL, 2016; NELSON; COX, 2018).

##### **4.7.2.1 Teste em Ágar Tríplice Açúcar e Ferro**

O teste de ágar Tríplice Açúcar e Ferro, do inglês ágar TSI, determina diferenciação de bacilos gram negativos com base na fermentação de glicose, lactose e sacarose além da formação ou não de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S). Cepas puras foram repicadas em ágar TSI e incubadas à temperatura de 35°C por 24 horas. A prova foi considerada positiva para culturas de *Aeromonas* spp. com a aparição de reação ácida, identificada pela mudança de coloração do meio de vermelho alaranjado para amarelo através do indicador ácido-base vermelho de fenol incorporado.

##### **4.7.2.2 Teste de resistência ao agente O/129**

Cepas suspeitas foram submetidas à prova de sensibilidade ao agente vibrioestático O/129, seguindo a metodologia proposta por Bauer-Kirby (BAUER *et al.*,

1966) – tendo melhor descrição do procedimento no capítulo 4.6 deste trabalho. Considerou-se como *Aeromonas* spp. os cultivos resistentes as duas concentrações ao agente antimicrobiano nesta prova (Figura 8).

**Figura 8:** Teste de susceptibilidade à duas concentrações do agente O/129 (10 µg e 150 µg). A esquerda uma cepa mostrando ser sensível as duas concentrações, com subpopulação às duas concentrações. A direita cepa mostrando ser resistente às duas concentrações, resultado típico *Aeromonas* spp.



Fonte: elaborada pelo autor.

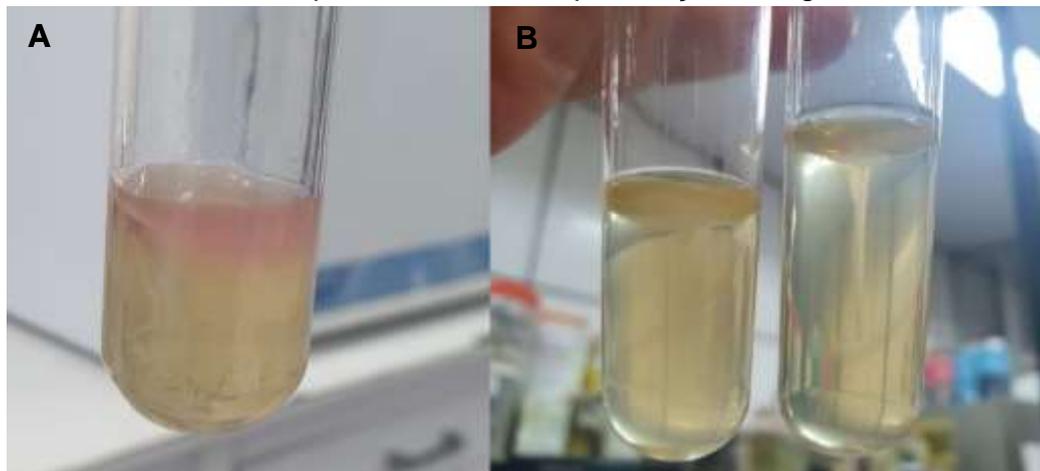
#### **4.7.3 Identificação do gênero *Pseudomonas* por metodologia adaptada**

A caracterização dos isolados de *Pseudomonas* spp. foi realizada de acordo com as Normas Técnicas da CETESB (2011) e do 'Bergey's Manual of Determinative Bacteriology' (MURRAY; BREED; SMITH, 1957). Para a identificação do gênero *Pseudomonas*, realizou-se a coloração de Gram e as culturas que apresentavam forma de bastonetes retos e curtos e gram-negativas foram repicadas para respectivas provas.

##### **4.7.3.1 Teste de produção de Indol e presença de motilidade**

Para os testes de indol e motilidade, foi utilizado o meio Indol Sulfeto Motilidade – do inglês, ágar SIM (Figura 9). Tubos contendo o meio SIM, foram inoculados com cepas suspeitas de *Pseudomonas* utilizando-se o auxílio de uma agulha de níquel-cromo, em seguida os tubos foram incubados por 24 horas a 35°C.

**Figura 9:** A. Prova positiva para Indol em Ágar SIM; B. O tubo a esquerda, teste positivo para motilidade, com turvamento do meio. O tubo a direita mostra crescimento apenas no local de perfuração da agulha.



Fonte: elaborada pelo autor.

O triptofano, um aminoácido essencial, é oxidado por algumas bactérias pela ação da enzima triptofanase. As bactérias que produzem a enzima triptofanase são capazes de degradar o aminoácido triptofano em ácido pirúvico, amônia e indol (CAMPBELL; FARRELL, 2016; NELSON; COX, 2018). A prova positiva para indol resulta em uma formação de anel vermelho cereja no meio após a inserção do reagente de Ehrlich (2 mL) - p-dimetilaminobenzaldeído, este reagente é sensível para detectar pequenas quantidades de indol. O teste positivo para motilidade é apresentado pelo crescimento ao longo da linha de inoculação com turvação do meio.

#### 4.7.3.2 *Teste da utilização de Citrato*

O Ágar Citrato de Simmons – ágar citrato, é um meio seletivo e diferencial que testa a capacidade de um organismo de usar citrato como única fonte de carbono e íons de amônio como única fonte de nitrogênio. Culturas suspeitas foram inoculadas em tubos de ensaio com inclinação longa e rasa de ágar citrato, incubadas em estufa de crescimento por até 5 dias a temperatura de 35°C. A resposta positiva (Figura 10) a utilização de citrato é observada com mudança de coloração do meio. O meio não inoculado será verde-escuro devido ao pH da amostra e ao azul de bromotimol.

**Figura 10:** O tubo a esquerda mostra crescimento bacteriano com utilização do citrato do meio (coloração azul, positivo). O tubo a direita mostra crescimento bacteriano sem utilização do citrato no meio (coloração verde, negativo).



Fonte: elaborada pelo autor.

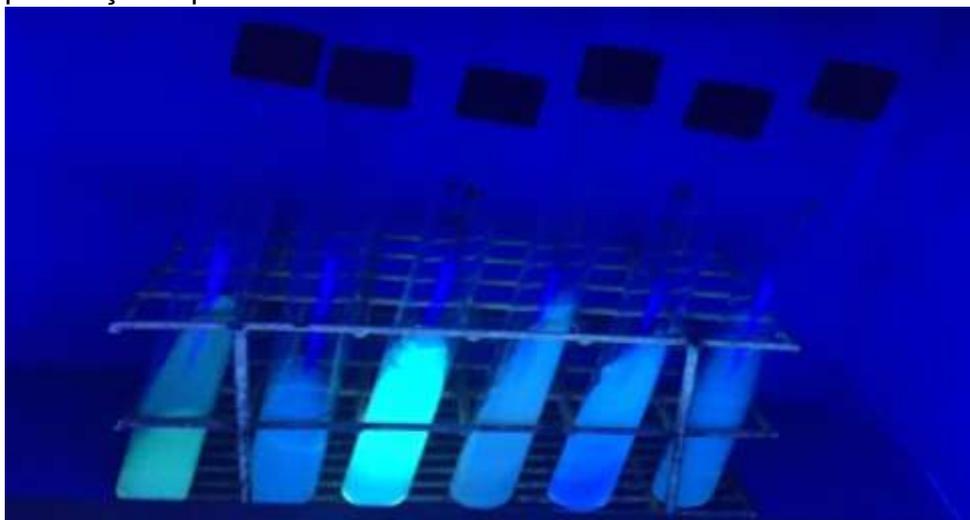
O crescimento indicativo da utilização de citrato depende da presença de uma enzima citrase produzida pelo organismo, que decompõe o citrato em ácido oxaloacético e ácido acético. Estes produtos são posteriormente convertidos em ácido pirúvico e dióxido de carbono. O dióxido de carbono gerado combina-se com sódio e água para formar carbonato de sódio, um produto alcalino. A alcalinidade do meio é indicada por uma mudança na cor do indicador de pH. A mudança no pH muda o indicador azul de bromotimol no meio de verde para azul acima de pH 7,6 e isso constitui um teste positivo.

#### 4.7.3.3 *Teste da presença de Pilocianina*

Espécies de *Pseudomonas* spp. podem ser identificadas devido à sua produção característica de plocianina, um pigmento de fenazina azul-esverdeado, solúvel em água e fluorescente, associado à sua morfologia colonial e ao odor característico de aminoacetofenona semelhante a uva. Culturas suspeitas foram inoculadas com auxílio de uma alça de níquel-cromo em tubos de ensaio contendo o meio ágar A de King – King P (Figura 11), sendo este particularmente adequado para

identificar a presença de piocianina. O ágar King P, com inclinação longa e rasa, foi incubado em estufa de crescimento microbiológico por 24 horas a temperatura de 35°C.

**Figura 11:** Tubos inoculados com cepas suspeitas de *Pseudomonas* spp. contendo ágar King P, as amostras positivas, apresentam coloração fluorescente na presença de luz ultravioleta, exaltando a presença de piocianina.



Fonte: elaborada pelo autor.

#### 4.7.2.4 Teste de hidrolise da Esculina

Para a prova de esculina utiliza-se o meio ágar Bile Esculina – que contém esculina (componente diferencial) e citrato férrico responsáveis por fornecer íons férricos. A esculina é hidrolisada por microrganismos como *Pseudomonas* spp., capazes de formar dextrose e esculetina. Culturas de microrganismos isolados suspeitos foram incubadas em ágar esculina por 24 horas a 35°C. Após o período de incubação, observa-se prova positiva com a transformação do meio de sua cor âmbar original em marrom escuro para preto.

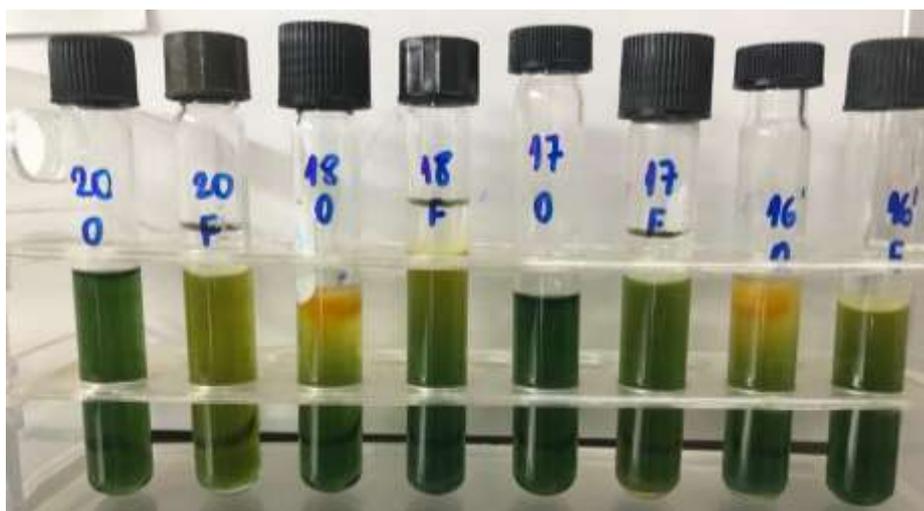
#### 4.7.3.5 Teste em ágar OF

O teste de fermentação oxidação é usado para determinar se um organismo utiliza substratos de carboidratos para produzir subprodutos ácidos. A determinação se um organismo é oxidativo ou fermentativo, foi observada utilizando-

se o meio de Hugh e Leifson (LEIFSON, 1963), comumente chamado de meio OF (Figura 12), que contém triptona e azul de bromotimol (um indicador). Foram necessários dois tubos para a interpretação do teste OF. Ambos foram inoculados e um dos tubos (tubo F) coberto com óleo mineral, produzindo um ambiente anaeróbico, foi deixado em estufa de crescimento por até 5 dias a temperatura de 35°C.

O crescimento de microrganismos neste meio é observado através da triptona, que pode apresentar uma reação alcalina (cor azul escuro) ou utilizando glicose, que resulta na produção de ácido (transformando o bromotimol azul em amarelo). A prova positiva para *Pseudomonas* spp., se dá pela mudança de coloração no tubo sem cobertura com óleo mineral e na não mudança de coloração no tubo com óleo mineral, sendo essa formação oxidativa ou não fermentativa.

**Figura 12:** Tubos contendo ágar OF, as cepas 18 e 16, apresentando o tubo O (oxidação) com mudança de coloração e o tubo F (fermentação) sem alteração, demonstram prova positiva para *Pseudomonas* spp. não fermentadoras.



Fonte: elaborada pelo autor.

#### 4.8 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

O antibiograma de cepas selecionadas foi realizado pelo método de difusão em placa seguindo-se a metodologia proposta por Bauer-Kirby (BAUER, KIRBY, *et al.*, 1966), segundo a orientação técnica ditada pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017) envolvendo o uso dos seguintes antibióticos comerciais

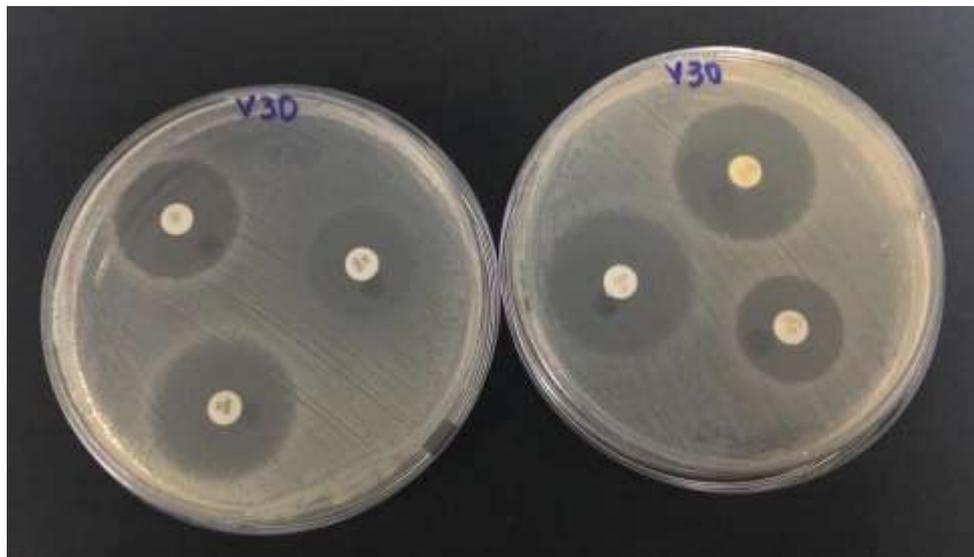
pertencentes a diferentes famílias:  **$\beta$ -lactâmicos** – Cefalotina-CFL (30 $\mu$ g), Amoxicilina/Clavulanato de Potássio-AmC (30 $\mu$ g); **Aminoglicosídeos** - Gentamicina-GEN (10 $\mu$ g); **Fluorquinolonas** - Ciprofloxacina-CIP (5 $\mu$ g); **Tetraciclina** - Tetraciclina-TET (30 $\mu$ g); **Macrolídeos** – Erythromycin-ERI (15 $\mu$ g). Estes discos antimicrobianos, foram mantidos sob refrigeração – de 2°C a 8°C, e utilizados dentro do prazo recomendado pelo fabricante. Antes da prova de susceptibilidade, os discos eram deixando à temperatura ambiente por uma hora.

As colônias, uma vez identificadas foram renovadas para um tubo de TSA (10 ppm de água do mar) e após 24 h de incubação (35°C) então transferidas e inoculadas em tubos contendo 9 mL de solução salina estéril a 0,85%. Foi utilizado um espectrofotômetro para a obtenção do padrão de densidade óptica da escala de McFarland (0,5), com leitura feita no comprimento de onda de 625nm, correspondendo a uma concentração bacteriana de  $5 \times 10^5$  unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL).

Das soluções ajustadas foram retiradas inóculos com emprego de “swab” estéril e semeados em placas de Petri contendo Ágar MH. Os discos impregnados com os respectivos antimicrobianos citados foram aplicados na superfície do meio com o auxílio de uma pinça flambada e então levemente pressionados no centro.

Após o período de incubação procede-se à leitura das placas medindo, em milímetros, o diâmetro da zona de inibição do crescimento das colônias (Figura 13). As cepas foram caracterizadas como resistentes, com sensibilidade intermediária ou sensível de acordo com uma tabela de mensuração dos halos para cada antimicrobiano usado, fornecido pelo fabricante dos discos impregnados.

**Figura 13:** Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos. Cepas que apresentam halos frente a presença de discos de antimicrobianos demonstram inibição do crescimento microbiano.



Fonte: elaborada pelo autor.

#### 4.9 Teste da camada dupla de ágar

Na última coleta os mucos dos animais coletados foram utilizados para verificação de presença de bacteriocinas ou metabolitos que pudessem impedir o crescimento microbiano testado. As amostras dos mucos uma vez identificadas foram dispostos em uma solução salina a 20 ppm de água do mar, então transferidos e inoculadas em placas de petri contendo uma fina camada de ágar MH e após 6 h de incubação (35°C), a inserção de um inóculo de *Pseudomonas aeruginosa* foi utilizada como controle positivo. Passado o período de incubação, as placas foram então transferidas para uma capela de fluxo laminar na presença de 1 mL de Clorofórmio – P.A., sem o contato direto no ágar, utilizando a tampa da própria placa de forma invertida.

Passados então um período de 15 minutos, tempo necessário para completa volatilização da substância, estas placas recebiam uma segunda camada de ágar MH este inoculado, contendo cepas bacterianas a serem testadas seguindo o padrão de densidade óptica da escala de McFarland (0,5): *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Vibrio parahemolyticus* sorotipo K 15 - esta cepa foi cedida pela FIOCRUZ, Rio de Janeiro, isolada de um surto de gastroenterite acontecido em

Cascavel (CE) em 1975 (HOFER, 1983); *Vibrio fischeri*; 1P2A2 (gram-negativa) e 1P2T5 (gram-positiva) -, estas duas últimas são cepas isoladas da própria pesquisa, uma gram negativa e a outra gram positiva, respectivamente. As placas foram deixadas em estufa de crescimento por 24 horas a temperatura de 35°C.

Após o período de incubação procede-se à leitura das placas verificando a existência de uma zona de inibição no crescimento das colônias.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Desenvolvimento da atividade de aquarismo na região

Na região, quanto a atividade de pesca, não se observa a utilização de métodos ofensivos de captura, ao contrário, por parte da comunidade pesqueira, existe um respeito pela conservação e manutenção da atividade. O motivo da conscientização na preservação do recurso e do cuidado com a nova atividade, vem em resposta a um duro histórico de depleção de recursos pesqueiros, à exemplo da pesca da lagosta - *Panulirus argus* e *Panulirus laevicauda*, que sofreu uma sobrepesca desde a década de 70, acentuando-se devido a práticas ilícitas de exploração, ausência na fiscalização e controle de uma atividade tipicamente artesanal (LINS OLIVEIRA; VASCONCELOS; REY, 1993).

Segundo Lee (1996), regiões recifais, como a de Icapuí, podem apresentar aplicação na pesca comercial não consuntiva, como organismos capturados para o comércio de aquários marinhos. Sabe-se que a coleta e a comercialização desses animais ornamentais, quando feita de forma responsável, trazem numerosos benefícios, como a sustentabilidade da atividade e inserção econômica na região (DARLING; DAGATA, 2017).

Por outro lado, é importante compreender que a pesca do recurso na região é provavelmente o uso humano com maior potencial nocivo. Segundo Bryant, Burke *et al.* (1998), a pesca nessas regiões pode ter impacto negativo nos recifes costeiros quando inclui a sobrepesca ou o uso de métodos destrutivos de colheita afetando até mesmo áreas remotamente, distantes dos impactos usuais das atividades humanas.

Em um cenário futuro, esta atividade pode ser considerada como potencial fornecedora e incentivadora para a conservação do habitat de recife local e provedor de subsistência à comunidade costeira que vive em uma área de baixa renda (BUNTING; HOLTHUS; SPALDING, 2003; DARLING; DAGATA, 2017). Para Moe (2003), nesse sentido, a pesca de peixes ornamentais é uma atividade de alto valor agregado que propicia a preservação e aumento do conhecimento do ambiente.

## 5.2 Contagem e abundância de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHC), *Vibrio*, *Aeromonas* e *Pseudomonas* nas amostras de Icapuí/CE

A tabela 2 mostra a estimativa em Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC/mL) de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHC), *Vibrio*, *Aeromonas* e *Pseudomonas* nas amostras de água do sistema de contenção dos animais e muco de peixes ornamentais.

**Tabela 2:** Estimativa de contagem padrão em placas (CPP) de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHC), *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp. e *Pseudomonas* spp. nas amostras de água e muco de peixes ornamentais de Icapuí/CE.

Coleta	Amostragem	Contagem de Bactérias (UFC/mL)			
		BHC	<i>Vibrio</i> spp.	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp.
1 <sup>a</sup>	Água	1,09x10 <sup>6</sup>	4,05x10 <sup>4</sup>	0	0
	Peixe 1	4,55x10 <sup>6</sup>	8,65x10 <sup>5</sup>	5,00x10 <sup>1</sup>	5,00x10 <sup>1</sup>
	Peixe 2	1,02x10 <sup>7</sup>	1,20x10 <sup>6</sup>	4,55x10 <sup>3</sup>	0
	Peixe 3	9,55x10 <sup>6</sup>	1,10x10 <sup>6</sup>	9,20x10 <sup>3</sup>	0
2 <sup>a</sup>	Água	1,50x10 <sup>4</sup>	0	5,00x10 <sup>3</sup>	0
	Peixe 4	9,55x10 <sup>4</sup>	9,80x10 <sup>3</sup>	5,50x10 <sup>2</sup>	0
	Peixe 5	1,68x10 <sup>5</sup>	2,90x10 <sup>3</sup>	0	0
	Peixe 6	3,40x10 <sup>3</sup>	0	0	0
3 <sup>a</sup>	Água	3,45x10 <sup>6</sup>	0	0	0
	Peixe 7	9,00x10 <sup>4</sup>	0	0	0
	Peixe 8	3,00x10 <sup>4</sup>	0	1,00x10 <sup>2</sup>	0
	Peixe 9	3,65x10 <sup>5</sup>	1,40x10 <sup>3</sup>	5,00 x10 <sup>2</sup>	0

Fonte: dados da pesquisa.

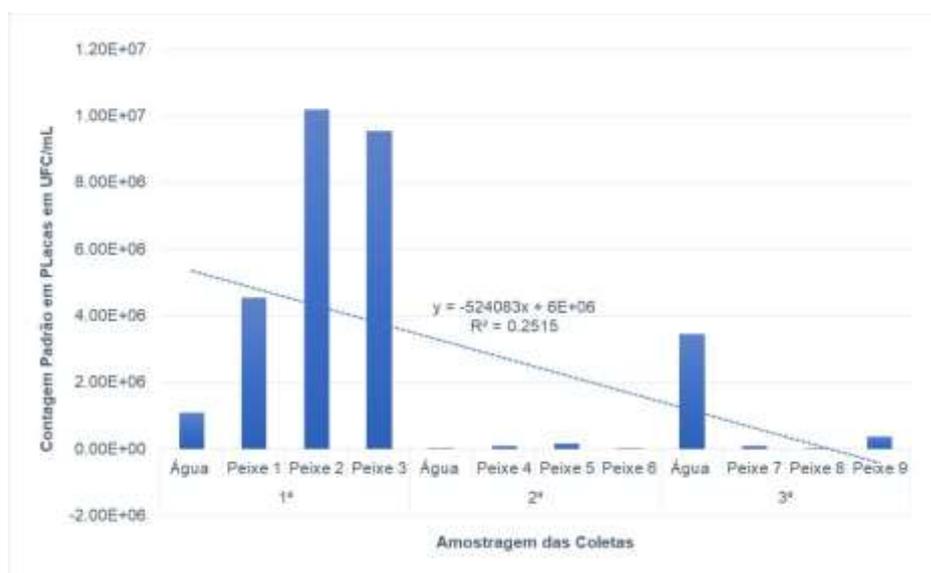
Para as amostragens de muco de peixes nos mesmos pontos, o UFC/mL de BHC variou entre os valores de 1,02x10<sup>7</sup> (Peixe 2, primeira coleta) a 3,40x10<sup>3</sup> (Peixe 6, segunda coleta). Como observa-se na tabela 2 as unidades de medida entre a água (UFC/mL), a superfície de peixes (UFC/cm<sup>2</sup>) e o muco dos animais (UFC/mL)

são muito diferentes pelo que as comparações não são especialmente úteis (AUSTIN, 2006b).

Alguns trabalhos da literatura, sugerem que os peixes têm baixas populações bacterianas na pele. Fato observado no salmão do Atlântico (*Salmo salar*), que possui populações de  $10^2$  a  $10^3$  UFC/cm<sup>2</sup> de pele (HORSLEY, 1973), enquanto a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) apresentou populações bacterianas variando de  $10^1$  a  $10^7$  unidades formadoras de colônia por grama (DILER *et al.*, 2000).

No entanto, deve-se enfatizar que a relevância do uso do peso como unidade de medida para estimar populações bacterianas na pele é discutível. Com base na literatura, existem muitas semelhanças entre as populações bacterianas em peixes e água (APUN; YUSOF; JUGANG, 1999; AUSTIN, 1982, 1983; EVELYN; MCDERMOTT, 1961). Este trabalho optou por uma abordagem comparativamente fácil de estudar as populações de bactérias heterotróficas aeróbicas, com dados sugerindo que o número de bactérias na superfície dos peixes se aproxima dos números da água circundante em suas respectivas coletas, como mostra o Gráfico 1.

**Gráfico 1:** Estimativa de contagem padrão em placas (CPP) de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHC) e linha tendência entre as coletas e suas respectivas amostragem.



Fonte: dados da pesquisa.

Na análise dos dados da pesquisa é possível observar que o muco de determinados peixes, por exemplo, peixe 2 da 1ª coleta, possuem contagens de populações bacterianas superiores à da água que estavam contidos. Não é de

surpreender que haja dados sugerindo que o tamanho da população bacteriana reflete o nível de poluição da água, ou seja, contagens mais altas estão presentes em peixes oriundos de ambientes poluídos (ZMYSLOWSKA *et al.*, 2001) ou ainda pode-se inferir que houve influência do ato da captura, como estressor animal, por exemplo, influenciando a bioquímica do muco que cobre a superfície do animal e respectivamente a comunidade bacteriana do mesmo, além da imunidade a bactérias no animal (ELLIS, 1999). Assim, pode-se inferir que a comunidade de bactérias do muco, está apenas vagamente associada à superfície de peixes.

### **5.2.1 Ingerência do Sistema de Recirculação e Influência nas Contagens de Bactéria: situações de risco por manejo inadequado**

Importante destacar que existe uma tendência de linearidade negativa entre as coletas, descrita matematicamente pela função Y, que demonstra uma diminuição gradual na população de bactérias no sistema no decorrer dos períodos de amostragem (Gráfico 1).

Os resultados da pesquisa vão em oposição a dados, que abordam o assunto dos sistemas de recirculação de água. Autores fornecem informações suficientes para inferir que quanto maior o tempo de operação de um sistema de recirculação de água, maior será o acúmulo de determinados nutrientes e maior será a projeção e tendência à crescimento da população microbológica no meio, e isso no entanto, pode não inferir em malefício ao mesmo, pelo contrário, pode levar à um sistema de aspectos biológicos equilibrado evitando aparecimento de agentes patogênicos e epizootias (MARIBUS GGMBH, 2010; RAJA *et al.*, 2006; TIMMONS; 2018).

A não concordância de nossos resultados comparados com aqueles reportados pela literatura internacional pode ser explicada pelo fato da falta de suporte adequado por parte das pessoas que controlam o sistema de recirculação em questão, e desta forma todos os benefícios fornecidos por ele como controle ambiental, controle de resíduos, controle microbológico, qualidade dos animais estocados e disponibilidade do produto, tornando assim, os sistemas de recirculação menos atraentes (TIMMONS; GUERDAT; VINCI, 2018).

Com tais características, quanto as observações do sistema (Figura 14), destacou-se que as características do sistema se aplicam a um sistema semifechado

em termos de projeto de tanques, hidráulica, gerenciamento de peixes, qualidade da água etc. Da aplicação prática de princípios de engenharia do projeto, da construção e do gerenciamento do sistema aquático, este apresenta uma série de ajustes paliativos em sua formação, demonstrando um volume consistente de distúrbios técnicos.

**Figura 14:** Sistema de Recirculação de Água utilizado na contenção dos animais pescados no município de Icapuí/CE.



Fonte: elaborada pelo autor.

Dentre as falhas técnicas mais consideráveis e observadas, destaca-se a utilização incorreta e armazenamento inadequado de substâncias químicas e agentes antimicrobianos, estas mantêm correspondência direta sobre os aspectos microbiológicos, abordados nesse capítulo.

Os agentes sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ), formaldeído ( $\text{H}_2\text{CO}$ ) e antimicrobianos são utilizados no sistema como agentes sanitizantes, inibidores de crescimento bacteriano e fúngico (Figura 15). A utilização sem controle dos agentes químicos e antimicrobianos, além de explicar as baixas na contagem das populações microbiológicas entre as coletas, refletem em uma falha técnica que mantêm um risco microbiológico considerável (BRASIL, 2009).

Hasman *et al.* (2006) demonstraram em estudo a resistência ao cobre em colônias de *Enterococcus faecium* selecionada pela suplementação de ração para suínos com sulfato de cobre, igualmente, outro estudo demonstrou a resistência ao cobre por transferência conjugativa de dois plasmídeos em *Pseudomonas syringae* pv. tomate (BENDER; COOKSEY, 1986).

Em outro estudo, sobre enguias presentes em água doce, que estão expostas a elevadas concentrações de cobre, foi verificado um aumento na mortalidade devido a presença de espécies de *Vibrio* (*Vibrio anguillarum*). Os pesquisadores sugerem que o gênero *Vibrio* é comumente encontrado na microbiota de enguias e que o alto grau de cobre no ambiente pode acarretar patogenicidade entre os microrganismos e os peixes ali existentes (RODSAETHER *et al.*, 1977).

Igualmente, Spicher e Peters (1976) demonstraram a resistência de diferentes microrganismos ao formaldeído, destacando as diferentes colônias de *Pseudomonas aeruginosa* utilizadas que variaram amplamente quanto à suscetibilidade ao mesmo. No estudo, para obter efeitos microbicidas iguais, foram necessárias concentrações de formaldeído quase três vezes mais altas para a cepa mais resistente que a necessária para a cepa mais suscetível de *Pseudomonas aeruginosa*.

Outrossim, fica evidente que estes manejos inadequados podem propiciar diversos malefícios diretos e indiretos -, como facilitador da sobreposição de agentes patogênicos emergentes, aumento em relatos de epizootias e transposição não desejada de muitas doenças do ambiente natural para os aquários (MARIBUS GGMBH, 2010; SWEET; JONES; BYTHELL, 2011).

**Figura 15:** Utilização de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) e formaldeído ( $\text{H}_2\text{CO}$ ) no sistema de recirculação de água para peixes ornamentais no município de Icapuí/CE.

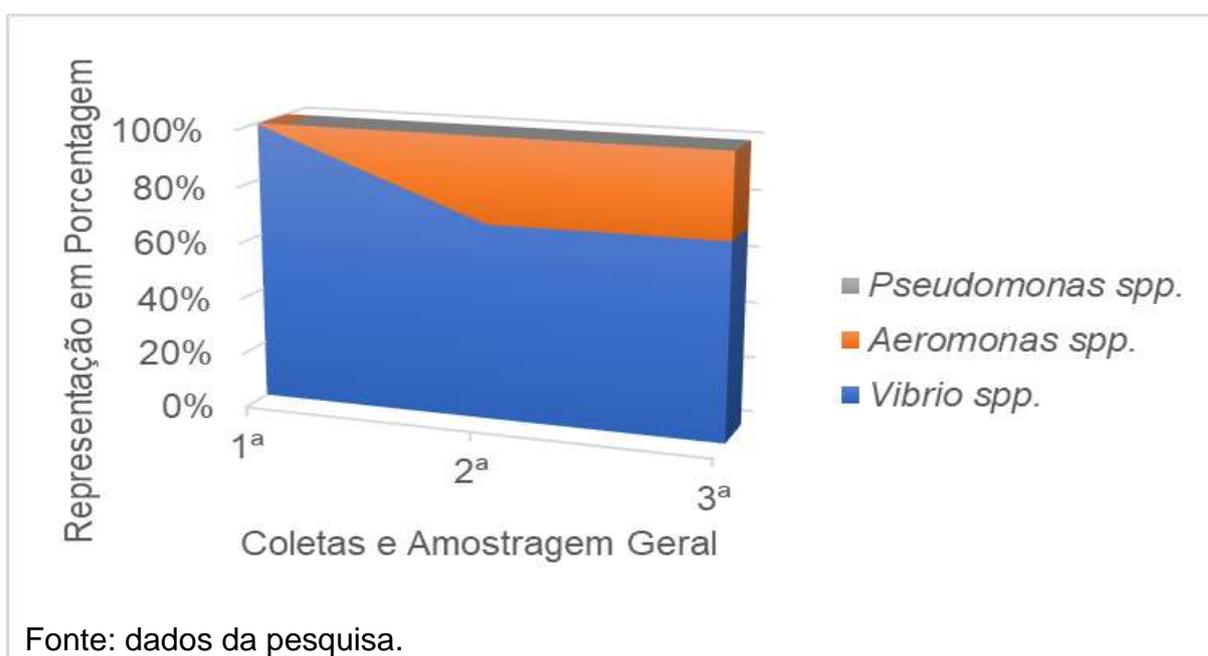


Fonte: elaborada pelo autor.

### 5.2.2 Diversidade de *Vibrio*, *Aeromonas* e *Pseudomonas* de peixes ornamentais nas amostras de Icapuí/CE

Como descrito anteriormente, as bactérias da superfície e água de peixes de ambiente marinho incluem as bactérias típicas da água do mar, contendo por exemplo, os gêneros *Vibrio*, *Aeromonas* e *Pseudomonas* (Gráfico 2). Este tipo de caracterização das comunidades microbianas e proporção de gêneros patogênicos associados ao comércio de peixes ornamentais beneficia de forma ampla os envolvidos com a indústria de ornamentais que estejam preocupados com a prudência de populações emergentes comprometidas (SMITH *et al.*, 2012).

**Gráfico 2:** Porcentagem de bactérias dos gêneros *Vibrio*, *Aeromonas* e *Pseudomonas* somada a todas amostragens da microbiota - água e mucos, em estudo - cidade de Icapuí/CE.



Como resultado da identificação definitiva de bactérias Gram-negativas e positivas para oxidase, observou-se a predominância de Víbrios frente à *Aeromonas* e *Pseudomonas*, este último com pouca ou nenhuma representatividade nas coletas.

Os dados encontrados foram análogos, quanto a representatividade dos gêneros nas amostras, ao estudo de Grimes *et al.* (1993) que analisou a taxonomia numérica de bastonetes gram negativos e oxidase positiva de tubarões da família Carcharhinidae.

Em outro estudo, Smith *et al.* (2012), identificou em aquários de peixes ornamentais cerca de 30 filos, sendo o mais comum o filo Proteobacteria (52%), filo este, que estão contidas as bactérias do presente estudo. Utilizando-se de abordagens moleculares e sequenciamento, os autores caracterizaram a comunidade bacteriana da água de aquários, sendo este sequenciamento mais intimamente relacionado à onze espécies bacterianas com potencial de causar doenças em peixes, humanos ou outras espécies, dentre as quais destaca-se: *Vibrio cholerae*, *V. mimicus*, *V. vulnificus*, *Aeromonas schubertii*, *A. veronii* e *A. hydrophila*.

Os gêneros estudados são bem descritos na literatura como bactérias que ocasionam doenças em peixes usando uma série de mecanismos patogênicos (HANSEN; OLAFSEN, 1999; OLAFSEN, 2001; RINGØ *et al.*, 2010). Igualmente, estas são responsáveis por perdas significativas e merecedoras de atenção, como é caso da espécie *Aeromonas hydrophila*, que causou grande mortandade de peixes em todo o mundo ao longo da última década (JANDA; ABBOTT, 2010).

Em decorrência ao fato do aumento contínuo da taxa de aparecimento de doenças associadas à peixes nos últimos 20 anos, dá-se importância aos estudos das doenças bacterianas em peixes marinhos (AUSTIN; AUSTIN, 2012). Por outro lado, os efeitos nocivos de microrganismos sobre as populações na natureza são mais difíceis de determinar (BREITBART *et al.*, 2007; EILER; JOHANSSON; BERTILSSON, 2006). Para Munn (2005), deve-se abordar a ecologia natural desses organismos e os fatores que determinam sua capacidade de produzir doenças. Destaca-se ainda, entre os gêneros estudados, a possibilidade de presença de possíveis patógenos humanos nos peixes e em seus arredores.

No geral, ficou evidente neste estudo a incidência do gênero *Vibrio* frente aos outros gêneros estudados, situação comum com estudos de amostras de estuários, ou seja, mais próximas da costa (FERNANDES; KHANDEPARKER; SHENOY, 2020; NEOGI *et al.*, 2018; RIVERA; LUG; HAZEN, 1989).

De modo geral, Víbrios são considerados patógenos oportunistas, colonizando e causando doenças em peixes com o sistema imune debilitado. Em contrapartida, a algumas bactérias, como *Pseudomonas*, constituem-se como patógenos primários (AUSTIN; AUSTIN, 2012).

Para tanto, entende-se que o muco produzido pelos peixes se constitui como uma barreira ativa no sistema imunológico dos animais às infecções bacterianas. São em superfícies mucosas, que os agentes bacterianos primeiramente

lesam em um processo de infecção. Para os vertebrados, a resposta imune da mucosa desempenha um papel crucial no curso da infecção, considerado um componente chave da imunidade inata (INGRAM, 1980; MCNEILLY *et al.*, 2008).

Balenona *et al.* (1995) e Al-Arifa *et al.* (2011) demonstraram que o muco garante muitas funções biológicas importantes que permitem que os peixes sobrevivam e se adaptem ao seu ambiente. A exemplo do peixe 9 (Figura 16), que apresentava sinais clínicos de infecção na superfície do corpo, bem como descamação em algumas áreas, que obteve os maiores resultados de contagem de *Vibrio* e *Aeromonas* das amostragens de muco (Tabela 4). Sabe-se que as populações bacterianas que colonizam a superfície dos peixes também dependem fortemente do estado de saúde dos animais, portanto, o muco dos peixes pode incluir bactérias benéficas, oportunistas e patogênicas (AUSTIN, 2006a).

**Figura 16:** Exemplar juvenil da *Heteropriacanthus cruentatus* (Peixe 9) na medição do comprimento total do animal em estudo - cidade de Icapuí/CE.



Fonte: elaborada pelo autor.

Para estudar a adesão das bactérias aos peixes, sejam elas patogênicas ou não, é importante entender os mecanismos de fixação de bactérias no muco e na pele, bem como os principais fatores responsáveis por essa ação, enfatizando os gêneros aqui estudados (BENHAMED *et al.*, 2014).

Alguns estudos demonstraram como é determinado o processo de ligação bacteriana às superfícies, ocorrendo essencialmente em duas etapas. Na primeira etapa, as bactérias devem manter-se perto o bastante da superfície para permitir uma fixação primária, nesta etapa as bactérias podem ser facilmente removidas por ação mecânica. Forças físicas e químicas estão envolvidas nesse processo de fixação primária, como por exemplo, forças de Van Der Waals, forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas (CARPENTIER; CERF, 1993; GILBERT *et al.*, 1991; VAN LOOSDRECHT; NORDE; ZEHNDER, 1990).

Na segunda etapa do processo de fixação bacteriana, fixação esta irreversível das células da superfície dos animais, foi bem descrito por Dunne (2002), demonstrando como bactérias que se prendem à superfície utilizando-se de uma produção de exopolissacarídeo (EPS) e ou ligantes específicos, como pilus ou fímbrias que podem se complexar com a superfície. No final desta etapa, são necessárias forças físicas ou químicas demasiadamente fortes para remover as bactérias da superfície -, biofilmes, sendo a principal justificativa para o uso indevido de agentes químicos e antimicrobianos nos sistemas de recirculação.

Uma seleção forçada em resposta ao uso de agentes externos contra a microbiota do meio – água ou muco, levaria a uma seleção de bactérias com elevada produção de EPS e ou ligantes, podendo ser esta a principal causa de transposição não desejada de muitas doenças e patologias dos peixes e corais do ambiente natural para os aquários. Dandekar, Chugani e Greenberg (2012) descreveram que o aumento da densidade bacteriana dentro de um biofilme levaria as bactérias contidas a se comunicarem entre si, em um sinal de célula a célula. Dessa forma, podendo-se levar à secreção de moléculas que sinalizam quando a população atinge um limiar crítico. Esse processo, chamado de quorum sensing (do inglês, sensor de quórum), é responsável pela expressão de fatores de virulência, comunicação intra e interespecies microbianas (LIXA *et al.*, 2015; SCHAUDER; BASSLER, 2001).

Na presente pesquisa, o gênero *Pseudomonas* apresentou a menor representação em números comparado aos outros gêneros aqui analisados, entretanto, sabe-se que a sua importância como patógeno de peixes é destacável (ALTINOK; KAYIS; CAPKIN, 2006; HATJE *et al.*, 2014; PARK *et al.*, 2000). Determinadas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, por exemplo, produzem algumas proteases quando o número dessas bactérias atinge uma alta densidade no biofilme. Para estes casos, a infecção é raramente resolvida pelo mecanismo de defesa do

hospedeiro (CORTES; CONSUEGRA; SINISTERRA, 2011; FUQUA; WINANS; GREENBERG, 1994).

Estudo com *Aeromonas hydrophila* (MERINO *et al.*, 1997) demonstrou o importante papel do flagelo no estabelecimento da interação inicial com as superfícies mucosas. Da mesma forma, Chen *et al.* (2008) descreveram o desempenho importante na adesão pelo efeito do antígeno somático e do flagelo em *Vibrio alginolyticus*. Bordas *et al.* (1996) relataram que a capacidade adesiva do muco da pele, aparentemente não é fator de virulência definitivo em cepas patogênicas de *Vibrio*, isso porque essa interação específica depende de vários fatores ambientais como a salinidade e temperatura, está última a mais importante (HAMED *et al.*, 2018).

Existe a capacidade de cepas de *Vibrio* de utilizar o muco como fonte de carbono, este fato, poderia favorecer as espécies desse gênero se estabelecerem na pele dos peixes, com potencial para infecção de peixes estressados cultivados ou pescados (BORDAS *et al.*, 1996). Usando o muco da pele, camada protetora, como fonte de carbono e nutrientes os víbrios podem favorecer outras bactérias do meio ambiente a desenvolver biofilmes, estes podem ainda aumentar a possibilidade de transferência de genes entre bactérias, podendo ser significativo pela permutação de genes de resistência à bactérias susceptíveis, convertendo uma cepa previamente não virulenta em um patógeno virulento (MONTGOMERY; KIRCHMAN, 1994).

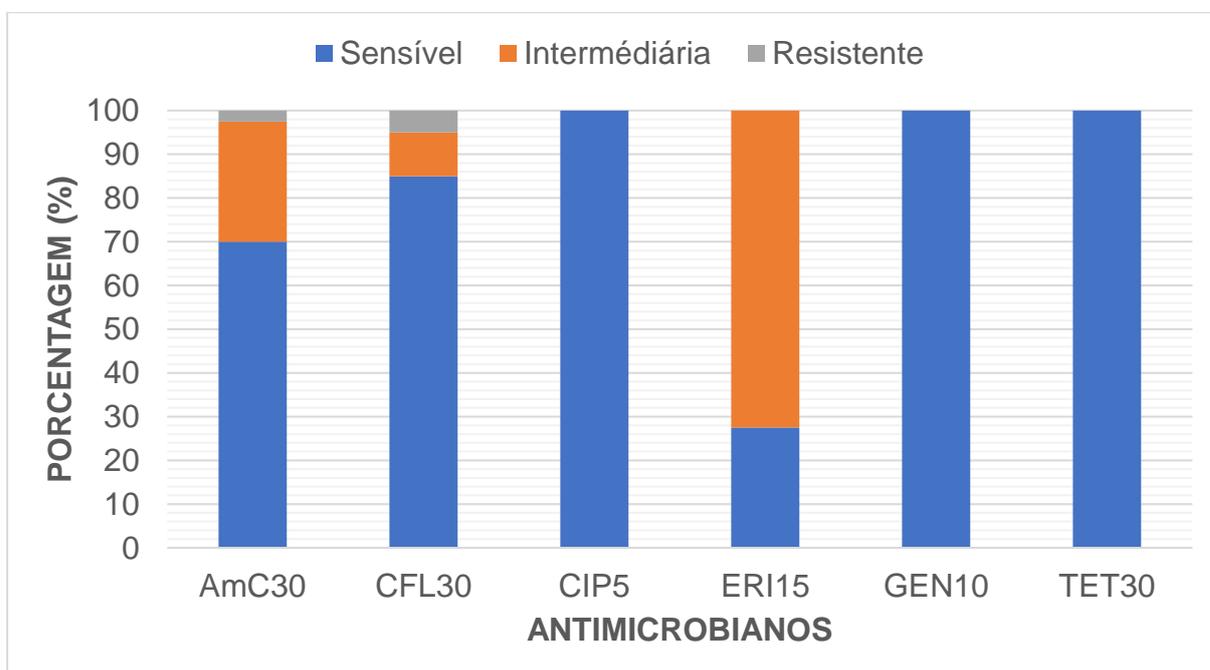
### **5.3 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos**

Antibióticos são adições muito úteis à caixa de ferramentas de qualquer gestor na saúde de peixes. A OIE (Organização Mundial de Saúde Animal) em seu exemplar do ano de 2019, o Código Sanitário para Animais Aquáticos (o Código Aquático) considerou, portanto, que é importante garantir o acesso contínuo a agentes antimicrobianos eficazes, sendo essenciais para tratar e controlar doenças infecciosas em animais aquáticos. Yanong descreveu em 2003 que a capacidade dos antibióticos de ajudar a eliminar uma doença de peixe depende de vários fatores: 1. A doença realmente possui um componente bacteriano? 2. As bactérias envolvidas são sensíveis ao antibiótico escolhido? 3. Estão adequados os intervalos de uso e dosagem do medicamento no tratamento? 4. Estressores contribuintes à má saúde dos animais foram removidos ou reduzidos?

Ressalta-se não apenas a grande variedade de patogenias bacterianas, mas também a resistência a tratamentos antimicrobianos adquirida por esses patógenos pelos manejos de captura. Embora algumas bactérias constituam patógenos primários, muitas outras são oportunistas, colonizando e causando doenças em peixes com o sistema imune debilitado (AUSTIN e AUSTIN, 2012).

Os resultados deste trabalho demonstram os riscos entrelaçados ao uso indevido de agentes químicos. Na Gráfico 3 é mostrado o percentual de resistência das cepas de *Vibrio* isoladas de amostras de água e muco de peixes ornamentais nas coletas realizadas frente a diferentes agentes antimicrobianos. O maior percentual de resistência observado foi a Cefalotina-CFL30 (5,0%), seguido por Amoxicilina/Clavulanato de Potássio-AmC30 (2,5%), pertencentes a família dos  $\beta$ -lactâmicos. Os percentuais de cepas intermediárias foi de Eritromicina-ERI15 (73%), Amoxicilina/Clavulanato de Potássio-AmC30 (28%) e Cefalotina-CFL30 (10%). As cepas testadas sensíveis foram para os antibióticos Eritromicina-ERI15 (28%), Amoxicilina/Clavulanato de Potássio-AmC30 (70%), Cefalotina-CFL30 (80%), e a maior porcentagem para Ciprofloxacina-CIP5, Gentamicina-GEN10 e Tetraciclina-TET30 (100%).

**Gráfico 3:** Percentual de susceptibilidade a diferentes antimicrobianos de 40 cepas de *Vibrio* spp. isoladas de água e muco de peixes ornamentais no litoral de Icapuí/CE.



Fonte: dados da pesquisa.

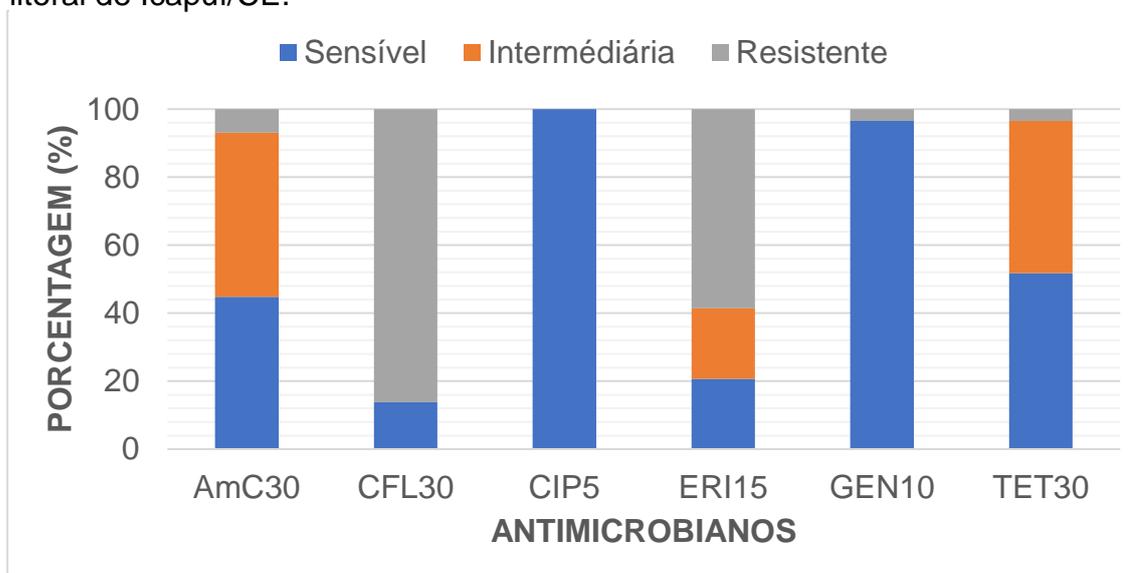
Em um estudo de Butzler, Dekeyser e Lafontaine (1974), 121 cepas de *Vibrio* spp. foram testadas quanto à suscetibilidade in vitro a 12 antibióticos. Gentamicina e eritromicina foram as drogas mais ativas contra víbrios. Mais de 90% das cepas foram resistentes à cefalotina. As menores atividades foram observadas com cloranfenicol, estreptomicina e tetraciclina. Os resultados desta pesquisa foram antagônicos para os antibióticos eritromicina e tetraciclina, houve uma alta incidência de cepas com perfil intermediário a eritromicina e perfil sensível para tetraciclina.

Em suas pesquisas de revisão envolvendo a resistência a antibióticos de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* em vários países os autores Elmahdi, Dasilva e Parveen (2016), identificaram que isolados ambientais e clínicos apresentaram perfis semelhantes de resistência a antibióticos. Sendo os perfis de resistência a antibióticos que foram mais frequentemente observados envolviam ampicilina, penicilina e tetraciclina, independentemente dos países. O perfil de resistência a tetraciclina deste trabalho foi o inverso aos dados obtidos com nossa pesquisa.

O percentual de resistência das cepas de *Aeromonas* também isoladas de amostras de água e muco de peixes ornamentais nas coletas realizadas frente a diferentes agentes antimicrobianos é apresentado no gráfico 4. O maior percentual de resistência observado foi a Cefalotina-CFL30 (86%), seguido por Eritromicina-ERI15 (59%), Amoxicilina/Clavulanato de Potássio-AmC30 (7%) e Gentamicina-GEN10, Tetraciclina-TET30 (3%).

Os percentuais de cepas intermediárias, foram maiores para Eritromicina-ERI15 (21%), Tetraciclina-TET30 (45%) e Amoxicilina/Clavulanato de Potássio-AmC30 (48%). A sensibilidade bacteriana foi mostrada para os seguintes antibióticos: Amoxicilina/Clavulanato de Potássio-AmC30 (45%), Cefalotina-CFL30 (14%), Eritromicina-ERI15 (21%), Gentamicina-GEN10 (97%) e Tetraciclina-TET30 (52%), 100% das cepas de *Aeromonas* spp. resultou em sensível a Ciprofloxacina-CIP5, apresentando a maior eficácia frente a este gênero bacteriano (Gráfico 4).

**Gráfico 4:** Percentual de susceptibilidade a diferentes antimicrobianos de 29 cepas de *Aeromonas* spp. isoladas de água e muco de peixes ornamentais no litoral de Icapuí/CE.

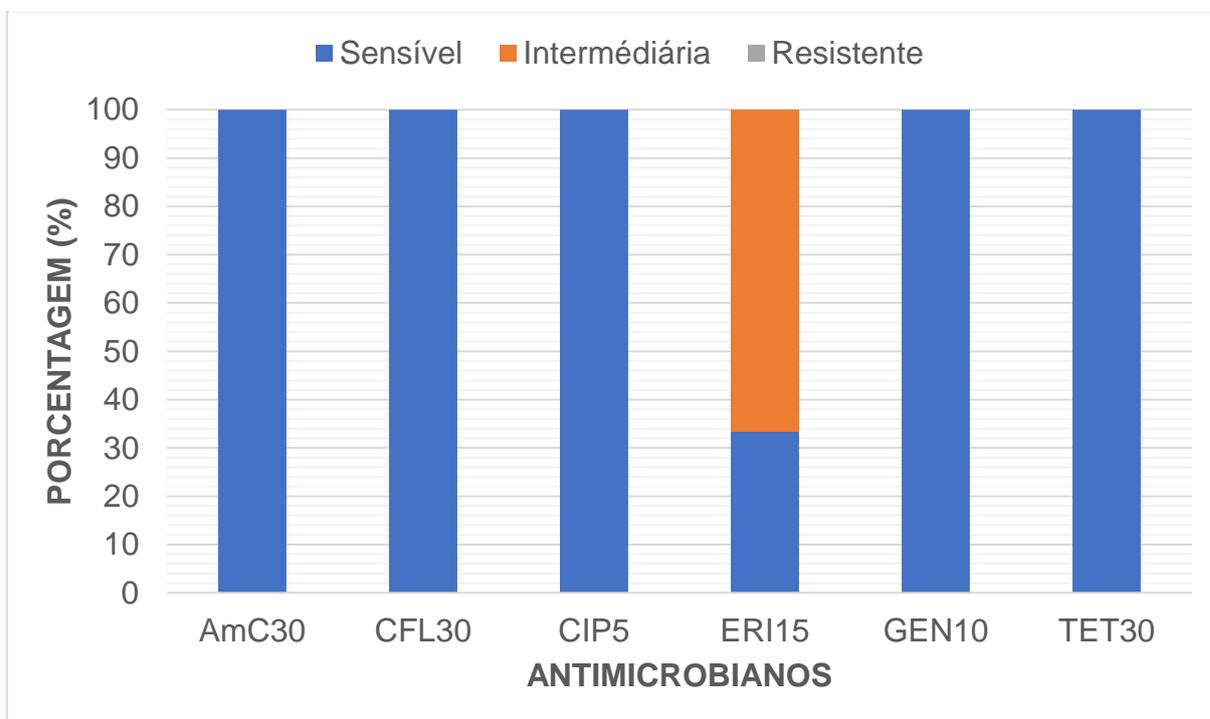


Fonte: dados da pesquisa.

Esses resultados estão desconformes ao estudo de Son *et al.* (1997), que avaliaram a resistência a antibióticos e perfil plasmídial de isolados de *Aeromonas hydrophila* de peixes cultivados, Tilapia (*Tilapia mossambica*). Os autores da pesquisa encontraram em todas as cepas analisadas sensibilidade à gentamicina e resistência dos isolados à tetraciclina (48%) e eritromicina (43%). A explicação para resistência das cepas à tetraciclina, deve-se ao fato do gene de resistência da mesma poder ocorrer frequentemente em cepas ambientais e poder estar presente em grandes plasmídeos horizontalmente transferíveis em *Aeromonas* spp. de pisciculturas (AGERSØ *et al.*, 2007).

Na Gráfico 5 é mostrado o percentual de resistência das cepas de *Pseudomonas* igualmente isoladas de amostras de água e muco de peixes ornamentais nas coletas realizadas frente a diferentes agentes antimicrobianos. Não houve presenças de resistência observada nas cepas testadas frente aos agentes antimicrobianos utilizados.

**Gráfico 5:** Percentual de susceptibilidade a diferentes antimicrobianos de 3 cepas de *Pseudomonas* spp. isoladas de água e muco de peixes ornamentais no litoral de Icapuí/CE.



Fonte: dados da pesquisa.

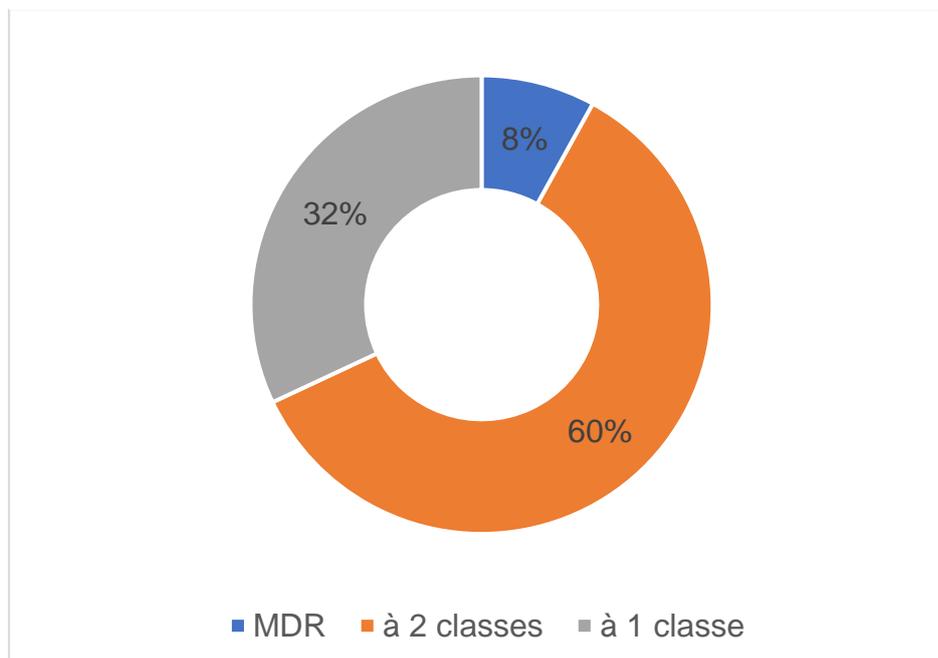
Os percentuais de cepas intermediárias estiveram apenas presente para Eritromicina-ERI15, onde descreveu a situação em cerca de 67%. Das cepas testadas, 100% foram sensíveis aos seguintes antibióticos: Amoxicilina/Clavulanato de Potássio-AmC30, Cefalotina-CFL30, Ciprofloxacina-CIP5, Eritromicina-ERI15, Gentamicina-GEN10 e Tetraciclina-TET30 obtendo o melhor resultado geral de sensibilidade frente aos antibióticos testados perante todos os gêneros de bactérias analisadas.

Os resultados são divergentes à revisão literária de Drenkard (2003), que caracterizou a resistência a agentes antimicrobianos como importante nas infecções por biofilme. Dessa forma, as infecções causadas por biofilmes bacterianos são persistentes e muito difíceis de erradicar. Embora vários mecanismos tenham sido postulados para explicar a susceptibilidade reduzida a antimicrobianos em biofilmes bacterianos, está se tornando evidente que a resistência ao biofilme é multifatorial.

Dos três gêneros analisados, *Aeromonas* foi o que apresentou o maior número de cepas resistentes, 25 cepas a pelo menos um antibiótico testado, seguido por *Vibrio* com 3 cepas resistentes e *Pseudomonas* não apresentou resistência. Das cepas de *Aeromonas*, 8% teve seu perfil de resistência enquadrado como MDR –, multidroga resistente, suportando a presença de ao menos um agente em três ou mais classes de antimicrobianos, 60% delas com resistência a duas classes e 32% com resistência pelo menos uma classe testada (Gráfico 6).

Presume-se que a alta incidência de resistência em *Aeromonas* e sutis detecções de perfil intermediário em cepas de *Vibrio* de peixes ornamentais indicam que de alguma maneira o ambiente está tendo contato com os antimicrobianos testados, mesmo não havendo relatos de utilização por parte dos gestores do sistema. A explicação mais aceitável vem da aquicultura, devido a pressão seletiva exercida pelos quimioterápicos utilizados na cultura de camarão nos estuários da região. Em 2014, o arranjo produtivo local (Litoral Leste) contava com 8 municípios, 176 fazendas legais, contando com uma área de 2.260 hectares de produção de camarão (TAHIM, ARAÚJO JUNIOR, 2014).

**Gráfico 6:** Perfil de resistência, em percentual, de 25 cepas de *Aeromonas* spp. resistentes a pelo menos uma classe de antimicrobianos, isoladas de água e muco de peixes ornamentais no litoral de Icapuí/CE, 8% apresentaram multirresistência a diferentes antimicrobianos.



Fonte: dados da pesquisa.

Sabe-se que espécies de *Aeromonas* suportam pelo menos três grupos de plasmídeos, que vão desempenhar papéis ecológicos diferentes, essenciais na manutenção do organismo no ambiente. Em estudo de Hedges, Smith e Brazil (1985), os autores observaram que plasmídeos ditos como instáveis em *Escherichia coli* pareciam ser particularmente bem adaptados à existência em espécies de *Aeromonas*. Assim, eles podem evoluir para uma integração mais completa no genoma de *Aeromonas*. Vale salientar que tanto o plasmídeo quanto a resistência antimicrobiana associada a espécies pertencentes de *Aeromonas* podem ser transferidos para um receptor por conjugação (BRUUN *et al.*, 2003; SON *et al.*, 1997).

A literatura demonstra os riscos entrelaçados do uso irregular de antimicrobianos associados a peixes e ambientes ocasionando em resistência bacteriana à antimicrobianos. Em 2000, Schmidt *et al.*, demonstraram a ocorrência de resistência à antimicrobianos de bactérias patogênicas oriundas de ambientes ao entorno de fazendas de trutas arco-íris dinamarquesas. Já em 1976, um estudo de Shotts Junior, Vanderwork e Campbell, trabalhando com cepas isoladas de peixes e

água de aquário que foram examinadas quanto à presença de fatores R, que transmitem transmissibilidade conjugal de resistência a antibióticos. Esse estudo sugere que o uso profilático da tetraciclina pode ser um fator predisponente ao surgimento de cepas de bactérias portadoras do fator R na água de aquários.

Existem conjuntos de estratégias - normas, regulamentação etc., para lidar com agentes antimicrobianos, merecendo o devido cuidado e estudo para assegurar práticas mais seguras, tanto para as pessoas como para os animais (BRASIL, 2009; OIE, 2019).

Quando os peixes são expostos a compostos antimicrobianos, sem dúvida haverá um impacto na composição da microbiota e nos padrões de resistência a antibióticos (AUSTIN, 2002; MOFFITT; MOBIN, 2006; PETERSEN; DALSGAARD, 2003). Isso, por sua vez, pode ter impacto na transmissão da resistência a antibióticos, como por meio de fatores R à outras bactérias (SHOTTS; VANDERWORK; CAMPBELL, 1976).

Igualmente, o uso indiscriminado de antimicrobianos na captura e conservação de peixes ornamentais talvez seja também uma das principais causas de transposição não desejada de muitas doenças e patologias dos peixes e corais do ambiente natural para os aquários, que em geral, ainda não foram sistematicamente descritas a relação dessas doenças com os vários aspectos ambientais, sendo, portanto, difícil de determinar seus efeitos (SWEET; JONES; BYTHELL, 2011).

Antes que os agentes químicos e antimicrobianos sejam considerados, fontes de estresse, como baixa qualidade da água, nutrição e manuseio ou transporte devem ser removidas ou reduzidas. Qualquer um desses fatores pode ser a principal causa da doença, pois as infecções bacterianas costumam ser respostas secundárias a esses problemas de gestão. Identificar estressores contribuintes e a taxa de infecção bacteriana, pode reduzir a perda total de peixes (YANONG, 2003).

#### **5.4 Teste da camada dupla de ágar**

Embora os estudos contendo a diversidade e abundância de bactérias associadas ao muco de peixes ornamentais seja interessante, o papel dessas bactérias e até mesmo o próprio muco também merece destaque. No entanto, as informações geralmente são irregulares, sendo relevante investigar se as bactérias

associadas aos peixes ou ao muco dos animais são ativos metabolicamente (ESTEBAN, 2012).

Ao reunir os dados, torna-se aparente (Tabela 4) que os componentes do muco dos peixes da terceira coleta foram associados ao processo de inibição do crescimento bacteriano das cepas testadas. Os mucos dos Peixes 7 e 9 conseguiram apresentar resultado positivo (inibição do crescimento) em quatro das sete cepas testadas, mesmo resultado da cepa padrão (CP) de *Pseudomonas* spp. testada. Numericamente, o melhor resultado foi oriundo do muco do Peixe 8 (animal da espécie *Pomacanthus paru*), obtendo inibição do crescimento frente a cinco das sete cepas testadas.

A secreção externa de muco não pode ser estudada isoladamente do estado geral de saúde dos peixes, igualmente, seja importante citar para enfatizar os dados, que o mesmo animal, obteve dados de contagem microbiológica para BHC no muco em menor proporção frente aos dos outros animais na coleta como mostra a Tabela 3 deste trabalho.

**Tabela 3:** Zonas de Inibição em crescimento de Cepas testadas frente a Amostras de muco de peixes ornamentais da terceira coleta oriundos a cidade de Icapuí/CE.

Zona de Inibição por Bacteriocinas/Metabolitos do Muco				
Cepa	Muco Peixe 7	Muco Peixe 8	Muco Peixe 9	CP
<i>Escherichia coli</i>	N	S	N	N
<i>Aeromonas caviae</i>	S	S	S	S
<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	S
1P2A2	S	S	S	S
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (C)	S	S	S	S
1P2T5	N	N	N	N
<i>Vibrio fischeri</i>	N	N	N	N

\*N=sem inibição no crescimento; S=com inibição no crescimento; CP= Cepa Padrão de *Pseudomonas*; 1P2T5= Cepa gram positivo oriunda do próprio experimento; 1P2A2= Cepa gram negativa oriunda do próprio experimento; C= sorotipo K 15 - FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

Fonte: dados da pesquisa.

Sabe-se que o muco de peixes está envolvido nas funções do sistema imune dos animais, além de seu papel como barreira biológica (SALINAS; ZHANG;

SUNYER, 2011). Influenciado pelo ambiente aquático, as propriedades físicas, químicas e biológicas do meio, refletem em adaptações no muco de peixes, como estrutura e função. De fato, o muco é composto essencialmente, de glicoproteínas fortemente adesivas, de alto peso molecular, filamentosas e altamente glicosiladas -, ligação covalente irreversível entre moléculas de glicose e aminoácidos de uma proteína, denominada mucinas. Além disso, o muco contém muitas outras substâncias que poderiam evitar a adesão, colonização ou invasão de bactérias patogênicas, papel importante nas defesas imunológicas. Dentre essas substâncias estão: proteínas C reativas, proteases, lectinas, lisozima, hemolisinas, aglutinina, enzimas proteolíticas, peptídeos antimicrobianos e imunoglobulinas (ESTEBAN, 2012).

Por outro lado, algumas bactérias produzem compostos inibidores, particularmente no trato digestivo, mas podendo também acontecer no muco de peixes. Estas bactérias podem ser responsáveis pelo controle da colonização de possíveis patógenos em peixes (RINGØ *et al.*, 2000, 2010), à exemplo de Sugita *et al.* (1997), que ao analisar bactérias do gênero *Vibrio* sp. recuperado do intestino de um peixe rabo-de-cavalo (*Leiognathus nuchalis*) na costa do Japão, identificou um composto inibitório considerado pelos autores como uma provável bacteriocina ou uma substância semelhante que propiciava a bactéria ser um agente causal de pasteurelose, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

Usando o mesmo método de dupla camada de ágar, 940 isolados aeróbicos e anaeróbicos obtidos do trato digestivo de peixes de rio, água e sedimentos no Japão foram examinados quanto a antagonismo (SUGITA *et al.*, 1997a). Alguns dos isolados do trato digestivo dos animais inibiram os organismos alvo, que incluíam *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. A implicação dos dados dessa pesquisa foi que determinadas bactérias antagonistas podem muito bem influenciar a composição da microbiota da superfície de peixes ocasionando a produção de compostos inibitórios, como aconteceu no estudo de Sugita *et al.* (1997b), no trato digestivo.

De fato, foi demonstrado que a saúde dos peixes depende fortemente da microbiota de seu muco a fim de proteger os peixes de invasão patogênica. Dependendo de vários fatores como espécies de peixes, forma de pesca e contenção em sistemas de recirculação de água, saúde, ambiente, origem da microbiota que coloniza o muco, muitos tipos de interação podem estar implicados para prevenir a infecção por patógenos (BENHAMED *et al.*, 2014).

É importante levar em consideração que, além do sistema imunológico, os peixes têm uma comunidade bacteriana que pode inibir a adesão ou o desenvolvimento de patógenos, mas esta é altamente afetada por fatores externos (HAMED *et al.*, 2018; SUGITA *et al.*, 1997b). No ambiente de recirculação de água marinha a virulência de bactérias pode ser produzida depois do contato direto com a pele ou muco dos peixes de agentes químicos e antimicrobianos, bem como através de algumas exoenzimas solúveis em água que são secretadas e liberadas por bactérias no ambiente marinho já virulentas (ESTEBAN, 2012; MOFFITT; MOBIN, 2006; PETERSEN; DALSGAARD, 2003; YANONG, 2003).

## 6 CONCLUSÃO

A diminuição gradual de BHC no decorrer dos períodos de amostragem destacam a importância em sua quantificação e fundamentam as falhas técnicas quanto a gestão do sistema de recirculação de água marinha para manutenção dos animais capturados. Deste modo, destaca-se a utilização incorreta e armazenamento inadequado de substâncias químicas e agentes antimicrobianos no sistema.

O presente estudo confirmou a presença de bactérias patogênicas (*Vibrio*, *Aeromonas* e *Pseudomonas*) em organismos marinhos de uso comercial tanto na água de sistemas de recirculação como no muco de peixes ornamentais, destacando a importância do controle microbiológico na estimação de risco por doenças em organismos aquáticos.

A presença de bactérias em peixes ornamentais com resistência intermediária e multirresistentes (Ex. *Aeromonas*) a antibióticos de interesse no uso veterinário e clínico unido a detecção de falhas técnicas na gestão do sistema de recirculação de água marinha para manutenção dos animais capturados e o uso incorreto e armazenamento inadequado de substâncias químicas e agentes microbianos ratificam a necessidade de um manejo sustentável na preservação desta importante atividade de aquarismo.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos com esse trabalho poderão contribuir para a melhoria da atividade do aquarismo não só no local de estudo bem como, em outras locais onde se aplica a atividade de captura e comércio de peixes ornamentais.

A pesca de ornamentais na região de Icapuí/CE, requer cuidados, diante, dos dados demonstrados, caso positivo, haverá na região um aumento da capacidade de desenvolvimento dos pescadores, crescente valorização do mercado ornamental e preocupação no âmbito ambiental, estimulador do interesse e esforços na preservação.

A vinculação das avaliações microbiológicas com a atividade pesqueira no setor de peixes ornamentais, enriquece o processo de preservação da pesca e motiva a conservação e manejo sustentável deste recurso, tornando esta atividade altamente significativa desde o ponto de vista econômico e ambiental.

Dada à importância do tema, torna-se necessário o desenvolvimento de projetos que visem a inibição da adesão e desenvolvimento de patógenos no muco dos peixes ornamentais, que possam desencadear o desenvolvimento de fármacos e, assim, efetivar uma finalidade diferenciada na preservação desses animais, motivando a conservação do recurso e contribuindo para o desenvolvimento de uma atividade econômica realmente significativa.

## REFERÊNCIAS

- AGERSØ, Y. *et al.* The tetracycline resistance gene tet(E) is frequently occurring and present on large horizontally transferable plasmids in *Aeromonas* spp. from fish farms. **Aquaculture**, [s. l.], v. 266, n. 1-4, p. 47-52, Junho 2007.
- AL-ARIFA, N. *et al.* Effect of alkaline pH on bioactive molecules of epidermal mucus from *Labeo rohita* (Rahu). **Turkish Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 29-34, Março 2011.
- ALDERTON, D. **Encyclopedia of aquarium and pond fish**. [s. l.], 5ª. ed.: DK Publishing (Dorling Kindersley), [s. l.], v. 1, 2008.
- ALTINOK, I.; KAYIS, S.; CAPKIN, E. *Pseudomonas putida* infection in rainbow trout. **Aquaculture**, [s. l.], v. 261, n. 3, p. 850-855, dezembro 2006.
- APUN, K.; YUSOF, A. M.; JUGANG, K. Distribution of bacteria in tropical freshwater fish and ponds. **International Journal of Environmental Health Research**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 285-292, 1999.
- AUSTIN, B. Taxonomy of bacteria isolated from a coastal, marine fish-rearing unit. **Journal of Applied bacteriology**, [s. l.], v. 53, n. 2, p. 253-268, 1982.
- AUSTIN, B. Bacterial microflora associated with a coastal, marine fish-rearing unit. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, [s. l.], v. 63, n. 3, p. 585-592, 1983.
- AUSTIN, B. **Marine microbiology**. 1ª. ed. New York: CUP Archive, 1988.
- AUSTIN, B. The Bacterial Microflora of Fish. **The Scientific World Journal**, [s. l.], v. 2, p. 558-572, 2002 2002.
- AUSTIN, B. Bacterial Pathogens of Marine Fish. In: BELKIN, S.; COLWELL, R. R. **Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment**. 1ª. ed. [S.l.]: Springer, [s. l.], v. 1, 2006a. Cap. 17, p. 391-413.
- AUSTIN, B. The Bacterial Microflora of Fish, Revised. **The Scientific World Journal**, [s. l.], v. 6, p. 931-945, 2006b.

AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. **Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish**. 6<sup>a</sup>. ed. Switzerland: Springer, Cham, [s. l.], v. I, 2012.

BAKER, A. C. *et al.* Corals' adaptive response to climate change. **Nature**, [s. l.], v. 430, n. 7001, p. 741, Agosto 2004.

BAKKEMOA, K. R. *et al.* Intracellular localisation and innate immune responses following *Francisella noatunensis* infection of Atlantic cod (*Gadus morhua*) macrophages. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 993-1004, Dezembro 2011.

BALBOA, C. The Consumption of Marine Ornamental Fish in the United States: A Description from U.S. Import Data. In: CATO, J.; BROWN, C. **Marine Ornamental Species: Collection, Culture & Conservation**. 1<sup>a</sup>. ed. Ames: Iowa State Press, 2003. Cap. 5, p. 65-76.

BALEBONA, M. C. *et al.* Influence of salinity and pH on the adhesion of pathogenic *Vibrio* strains to *Sparus aurata* skin mucus. **Aquaculture**, [s. l.], v. 132, n. 1-2, p. 113-220, Abril 1995.

BAUER, A. *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American journal of clinical pathology**, [s. l.], v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BENDER, C. L.; COOKSEY, D. A. Indigenous plasmids in *Pseudomonas syringae* pv. tomato: conjugative transfer and role in copper resistance. **Journal Of Bacteriology**, [s. l.], v. 165, n. 2, p. 534-541, Fevereiro 1986.

BENHAMED, S. *et al.* Pathogen bacteria adhesion to skin mucus of fishes. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 171, n. 1, p. 1-12, Junho 2014.

BIRKBECK, T. H. *et al.* *Pasteurella skyensis* sp. nov., isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 52, n. 3, p. 699-704, Maio 2002. ISSN 1466-5026.

BORDAS, M. A. *et al.* Kinetics of adhesion of selected fish-pathogenic *Vibrio* strains to skin mucus of gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.), [s. l.], v. 62, n. 10, p. 3650-3654, Outubro 1996.

BRASIL. **REGULAMENTO TÉCNICO PARA A FABRICAÇÃO, O CONTROLE DE QUALIDADE, A COMERCIALIZAÇÃO E O EMPREGO DE PRODUTOS ANTIMICROBIANOS DE USO VETERINÁRIO**. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Brasília, DF, p. 01-09. 2009. Seção 1.

BREITBART, M. *et al.* Exploring the Vast Diversity of Marine Viruses. **Oceanography**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 135-139, Junho 2007.

BRUUN, M. S. *et al.* Conjugal Transfer of Large Plasmids Conferring Oxytetracycline (OTC) Resistance: Transfer between Environmental Aeromonads, Fish-Pathogenic Bacteria, and Escherichia coli. **Journal Of Aquatic Animal Health**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 69-79, Março 2003.

BRYANT, D. *et al.* **Reefs at risk: a map-based indicator of threats to the world's coral reefs**. World Resources Institute. Washington, D.C., p. 56. 1998.

BUNTING, B.; HOLTHUS, P.; SPALDING, S. The Marine Aquarium Industry and Reef Conservation. In: CATO, J.; BROWN, C. **Marine Ornamental Species: Collection, Culture & Conservation**. 1ª. ed. Ames: Iowa State Press, 2003. Cap. 4, p. 109-124.

BUTZLER, J. P.; DEKEYSER, P.; LAFONTAINE, T. Susceptibility of Related Vibrios and Vibrio Fetus to Twelve Antibiotics. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 86-89, 1974.

CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Bioquímica**. 8ª. ed. São Paulo: Cengage Learning, [s. l.], v. Único, 2016.

CARNAHAN, A. M.; BEHRAM, S.; JOSEPH, S. W. Aerokey II: A Flexible Key for Identifying Clinical. **Journal of Clinical Microbiology**, 29, n. 12, Dezembro 1991. 2843-2849.

CARPENTIER, B.; CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. **Journal Of Applied Bacteriology**, [s. l.], v. 75, n. 6, p. 499-511, Dezembro 1993.

CASTRO, P.; HUBER, M. **Biologia Marinha**. 8ª. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.

- CHEN, Q. *et al.* Portal of entry for pathogenic *Vibrio alginolyticus* into large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*, and characteristics of bacterial adhesion to mucus. **Diseases Of Aquatic Organisms**, [s. l.], v. 80, n. 181-188, p. 181-188, Agosto 2008.
- CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Clinical and Laboratory Standards Institute Document M100-S27. Wayne. 2017.
- COHEN, J. *et al.* Estimates of Coastal Populations. **Science**, [s. l.], v. 278, n. 5341, p. 1209-1213, Novembro 1997.
- CORTES, M. E.; CONSUEGRA, J.; SINISTERRA, R. D. Biofilm formation, control and novel strategies for eradication. **Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances**, [s. l.], v. 2, p. 896-905, 2011.
- COSTANZA, R. *et al.* The value of the world's ecosystem services and natural capital. **Nature**, [s. l.], v. 387, p. 253–260, Maio 1997.
- DANDEKAR, A. A.; CHUGANI, S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Quorum Sensing and Metabolic Incentives to Cooperate. **Science**, [s. l.], v. 338, n. 6104, p. 264-266, Outubro 2012.
- DARLING, Emily S.; D'AGATA, Stephanie. Coral Reefs: Fishing for Sustainability. **Current Biology**, [s.l.], v. 27, n. 2, p.65-68, Janeiro 2017.
- DILER, O. *et al.* A study on qualitative and quantitative bacterial flora of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) living in different fish farms. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 251-259, 2000.
- DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington, DC: ASM, [s. l.], v. Único, 2001.
- DRENKARD, E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Microbes And Infection**, [s. l.], v. 5, n. 13, p. 1213-1219, Novembro 2003.
- DUNNE, W. M. Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 155-166, 2002.
- EILER, A.; JOHANSSON, M.; BERTILSSON, S. Environmental Influences on *Vibrio* Populations in Northern Temperate and Boreal Coastal Waters (Baltic and Skagerrak

Seas). **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, [s. l.], v. 72, n. 9, p. 6004-6011, setembro 2006. ISSN 0099-2240.

ELLIS, A. Immunity to bacteria in fish. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 291-308, Maio 1999.

ELMAHDI, S.; DASILVA, L. V.; PARVEEN, S. Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various countries: A review.. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 128-134, Agosto 2016.

ESTEBAN, M. Á. An Overview of the Immunological Defenses in Fish Skin. **Isrn Immunology**, [s. l.], v. 2012, p. 1-29, Outubro 2012.

EVELYN, T. P. T.; MCDERMOTT, L. A. Bacteriological studies of fresh-water fish: I. Isolation of aerobic bacteria from several species of Ontario fish. **Canadian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 375-382, 1961.

FERNANDES, Clafy; KHANDEPARKER, Rakhee D.s.; SHENOY, Belle Damodara. High abundance of *Vibrio* in tarball-contaminated seawater from Vagator beach, Goa, India. **Marine Pollution Bulletin**, [s.l.], v. 150, p.110773-110773, jan. 2020.

FUQUA, W. C.; WINANS, S. C.; GREENBERG, E. P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulator. **Journal Of Bacteriology**, [s. l.], v. 176, n. 2, p. 269-275, Janeiro 1994.

GILBERT, P. *et al.* Surface characteristics and adhesion of *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Applied Bacteriology**, [s. l.], v. 71, n. 1, p. 72-77, Julho 1991.

GRIMES, D. J. *et al.* Numerical taxonomy of Gram-negative, oxidase-positive rods from carcharhinid sharks. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 88-98, 1993.

HANSEN, G. H.; OLAFSEN, J. A. Bacterial Interactions in Early Life Stages of Marine Cold Water Fish. **MICROBIAL ECOLOGY**, New York, v. 38, n. 1, p. 1-26, Abril 1999.

HAMED, Said Ben *et al.* Fish pathogen bacteria: Adhesion, parameters influencing virulence and interaction with host cells. **Fish & Shellfish Immunology**, [s.l.], v. 80, p.550-562, set. 2018.

HASMAN, H. *et al.* Copper Resistance in *Enterococcus faecium*, Mediated by the *tcrB* Gene, Is Selected by Supplementation of Pig Feed with Copper Sulfate. **Applied And Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 72, n. 9, p. 5784-5789, Setembro 2006.

HATJE, E. *et al.* Population Dynamics of *Vibrio* and *Pseudomonas* Species Isolated from Farmed Tasmanian Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.): A Seasonal Study. **Microbial Ecology**, [s. l.], v. 68, n. 4, p. 679-687, Julho 2014.

HEDGES, R. W.; SMITH, P.; BRAZIL, G.. Resistance Plasmids of *Aeromonads*. **Microbiology**, [s. l.], v. 131, n. 8, p. 2091-2095, Agosto 1985.

HIBBING, M. E. *et al.* Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 15-25, Janeiro 2010.

HOEGH-GULDBERG, O. *et al.* Coral Reefs Under Rapid Climate Change and Ocean Acidification. **Science**, [s. l.], v. 318, n. 5857, p. 1737-1742, Dezembro 2007.

HOFER, E. Primeiro isolamento e identificação de *Vibrio parahaemolyticus* no Brasil, de infecção gastrointestinal humana. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 14, n. 3, p. 174-175, 1983.

HORSLEY, R. W. The bacterial flora of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in relation to its environment. **Journal of Applied Bacteriology**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 377-386, 1973.

HUGHES, T. P. *et al.* Climate Change, Human Impacts, and the Resilience of Coral Reefs. **Science**, [s. l.], v. 301, n. 5635, p. 929-933, Agosto 2003.

INGRAM, G. A. Substances involved in the natural resistance of fish to infection—a review. **Journal of Fish Biology**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 23-60, 1980.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 35-73, Janeiro 2010.

LEE, D. **The economics of managing Florida's coral reefs**. World Congress on Coastal and Marine Tourism. Honolulu: [s.n.]. 1996.

- LEIFSON, E. DETERMINATION OF CARBOHYDRATE METABOLISM OF MARINE BACTERIA. **Journal of Bacteriology**, Bethesda, v. 85, n. 5, p. 1183–1184, Maio 1963.
- LI, W. K. W. Annual average abundance of heterotrophic bacteria and Synechococcus in surface ocean waters. **Limnology And Oceanography**, Wiley, v. 43, n. 7, p. 1746-753, Novembro 1998.
- LINS OLIVEIRA, J.; VASCONCELOS, J.; REY, H. **A problemática da pesca de lagostas no Nordeste do Brasil**. Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Marinha do Nordeste - CEPENE. Tamandaré, p. 187-210. 1993.
- LIXA, C. *et al.* A structural perspective on the mechanisms of quorum sensing activation in bacteria. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, São Paulo, v. 87, n. 4, p. 2189-2203, Agosto 2015.
- LOWRY, T.; SMITH, S. A. **Mycobacterium sp. infection in cultured cobia (Rachycentron canadum)**. EUROPEAN ASSOCIATION OF FISH PATHOLOGISTS. [S.l.], p. 87-92. 2006. (0108-0288).
- MARIBUS GGMBH. **World ocean review: living with the oceans**. 1<sup>a</sup>. ed. Hamburgo: [s.n.], v. 1, 2010.
- MCALLISTER, D. **Status of the World Ocean and its biodiversity**. FAO of the UN. Ottawa, p. 14. 1995.
- MCNEILLY, T. N. *et al.* Role of Alveolar Macrophages in Respiratory Transmission of Visna/Maedi Virus. **JOURNAL OF VIROLOGY**, [s. l.], v. 82, n. 3, p. 526–1536, Fevereiro 2008.
- MERINO, S. *et al.* The role of flagella and motility in the adherence and invasion to fish cell lines by *Aeromonas hydrophila* serogroup O:34 strains. **FEMS Microbiology Letters**, v. 151, n. 2, p. 213-217, Junho 1997.
- MOE, M. Culture of Marine Ornamentals: For Love, for Money, and for Science. In: CATO, J.; BROWN, C. **Marine Ornamental Species: Collection, Culture & Conservation**. 1<sup>a</sup>. ed. Ames: Iowa State Press, 2003. Cap. 2, p. 11-28.

MOFFITT, C. M.; MOBIN, S. M. A. Profile of Microflora of the Posterior Intestine of Chinook Salmon before, during, and after Administration of Rations with and without Erythromycin. **North American Journal Of Aquaculture**, [s. l.], v. 68, n. 2, p. 176-185, Abril 2006.

MOHAMAD, N. *et al.* Natural Concurrent Infection of *Vibrio harveyi* and *V. alginolyticus* in Cultured Hybrid Groupers in Malaysia. **Journal of Aquatic Animal Health**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 88-96, março 2019. ISSN 1548-8667.

MONTGOMERY, M. T.; KIRCHMAN, D. L. Induction of chitin-binding proteins during the specific attachment of the marine bacterium *Vibrio harveyi* to chitin. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 60, n. 12, p. 4284-4288, 1994.

MUNN, C. **MARINE MICROBIOLOGY: ECOLOGY AND APPLICATIONS**. 2<sup>a</sup>. ed. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, 2011.

MUNN, C. B. Pathogens in the Sea: An Overview. In: BELKIN, S.; COLWELL, R. R. **Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment**. 1<sup>a</sup>. ed. Boston: Springer, v. 1, 2005. Cap. 1, p. 1-28.

MURRAY, E. G. D.; BREED, R. S.; SMITH, N. R. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 7<sup>a</sup>. ed. Baltimore: Williams and Wilkinson Company, [s. l.], v. Único, 1957.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7<sup>a</sup>. ed. [S.l.]: Artmed, [s. l.], v. Único, 2018.

NEOGI, Sucharit Basu *et al.* Environmental and hydroclimatic factors influencing *Vibrio* populations in the estuarine zone of the Bengal delta. **Environmental Monitoring And Assessment**, [s.l.], v. 190, n. 10, p.565-565, 3 set. 2018.

NIJMAN, V. An overview of international wildlife trade from Southeast Asia. **Biodiversity and Conservation**, [S.l.], v. 19, n. 4, p. 1101-1114, dez. 2009.

NURLIYANA, M. *et al.* Possible transmission routes of *Vibrio* spp. in tropical cage-cultured marine fishes. **Letters in Applied Microbiology**, [s. l.], v. Online Version, p. 1-12, Março 2019. ISSN 266-8254.

OIE. **Aquatic Animal Health Code (the Aquatic Code)**. 23. ed. Paris: World Organisation for Animal Health, [s. l.], v. I, 2019.

OLAFSEN, J. A. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. **Aquaculture**, [s. l.], v. 200, n. 1-2, p. 223-247, Agosto 2001.

OLIVIER, K. World trade in ornamental species. In: CATO, J.; BROWN, C. **Marine Ornamental Species: Collection, Culture & Conservation**. 1<sup>a</sup>. ed. Ames: Iowa State Press, 2003. Cap. 4, p. 49-63.

PARK, S. C. *et al.* Isolation of Bacteriophages Specific to a Fish Pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a Candidate for Disease Control. **Applied And Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 66, n. 4, p. 1416-1422, Abril 2000.

PETERSEN, A.; DALSGAARD, A. Antimicrobial resistance of intestinal *Aeromonas* spp. and *Enterococcus* spp. in fish cultured in integrated broiler-fish farms in Thailand. **Aquaculture**, [s. l.], v. 219, n. 1-4, p. 71-82, Abril 2003.

RAJA, K. *et al.* Diversity of Bacterial Populations in Recirculating Marine Aquarium. **Research Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 1, n. 5, p. 448-452, 2006.

RINGØ, E. *et al.* Lactic acid bacteria associated with the digestive tract of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 89, n. 2, p. 317-322, 2000.

RINGØ, E. *et al.* Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. **Aquaculture Research**, [s. l.], v. 41, n. 4, p. 451-467, 2010.

RIVERA, S.; LUGO, T.; HAZEN, T. C. Autecology of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in tropical waters. **Water Research**, [s. l.], v. 23, n. 7, p. 923-931, Julho 1989.

ROBERTS, C. Effects of Fishing on the Ecosystem Structure of Coral Reefs. **Conservation Biology**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 988-995, Outubro 1995.

RODSAETHER, Marianne C. *et al.* Copper as an initiating factor of vibriosis (*Vibrio anguillarum*) in eel (*Anguilla anguilla*). **Journal Of Fish Biology**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.17-21, Janeiro 1977. Wiley.

SALINAS, I.; ZHANG, Y.-A.; SUNYER, J. O.. Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. **Developmental & Comparative Immunology**, [s. l.], v. 35, n. 12, p. 1346-1365, Dezembro 2011.

SCHAUDER, S.; BASSLER, B. L. The languages of bacteria. **Genes & Development**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. 1468-1480, Junho 2001.

SCHMIDT, A. S. *et al.* Occurrence of Antimicrobial Resistance in Fish-Pathogenic and Environmental Bacteria Associated with Four Danish Rainbow Trout Farms. **ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY AND BIODEGRADATION**, [s. l.], v. 66, n. 11, p. 4908-4915, Novembro 2000.

SCHOLES, R.; SHEWAN, J. M. The present status of some aspects of marine microbiology. **Advances in Marine Biology**, Aberdeen, 1964. 133-170.

SEBENS, K. Biodiversity of coral reefs: what are we losing and why? **American zoologist**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 115-133, Fevereiro 1994.

SHOTTS JUNIOR, E. B.; VANDERWORK, V. L.; CAMPBELL, L. M. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, Occurrence of R Factors Associated with *Aeromonas hydrophila* Isolates from Aquarium Fish and Waters, [s. l.], v. 33, n. 4, p. 736-740, Abril 1976.

SMITH, K. F. *et al.* Microbial Diversity and Potential Pathogens in Ornamental Fish Aquarium Water. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. e39971, Setembro 2012. ISSN (2012).

SON, R. *et al.* Antibiotic resistance and plasmid profile of *Aeromonas hydrophila* isolates from cultured fish, *Telapia* (*Telapia mossambica*). **Letters In Applied Microbiology**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 479-482, Junho 1997.

SPALDING, M.; GREEN, E.; RAVILIOUS, C. **World Atlas of Coral Reefs**. 1<sup>a</sup>. ed. Berkeley: University of California Press Books, 2001.

SPICHER, G.; PETERS, J. Microbial resistance to formaldehyde. I. Comparative quantitative studies in some selected species of vegetative bacteria, bacterial spores, fungi, bacteriophages and viruses. **Zentralblatt fur Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene**, [s. l.], v. 163, n. 5-6, p. 486-508, Dezembro 1976.

SUGITA, H. *et al.* *Vibrio* sp. strain NM 10, isolated from the intestine of a Japanese coastal fish, has an inhibitory effect against *Pasteurella piscicida*. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 63, n. 12, p. 4986-4989, 1997a.

SUGITA, H. *et al.* Antibacterial Abilities of Intestinal Microflora of the River Fish. **Fisheries Science**, [s. l.], v. 63, n. 3, p. 378-383, 1997b.

SWEET, M.; JONES, ; BYTHELL, J. Coral diseases in aquaria and in nature. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, [s.l.], v. 92, n. 4, p. 791-801, Novembro 2011.

TAHIM, E. F.; ARAÚJO JUNIOR, I. F. D. A carcinicultura do nordeste brasileiro e sua inserção em cadeias globais de produção: foco nos APLs do Ceará. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, [s. l.], v. 52, n. 3, p. 567-586, Setembro 2014.

TEITELBAUM, A. *et al.* **Aquarium trade in the Pacific**. SPC Live Reef Fish Information Bulletin. [S.l.], p. 3-6. 2010.

TIMMONS, M. B.; GUERDAT, T.; VINCI, B. J. **Recirculating aquaculture**. 4<sup>a</sup>. ed. Ithaca: Ithaca Publishing Company LLC, [s. l.], v. Único, 2018.

VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; NORDE, W.; ZEHNDER, A. J. B. Physical Chemical Description of Bacterial Adhesion. **Journal Of Biomaterials Applications**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 91-106, Outubro 1990.

VIEIRA, R. H. S. D. F. **MICROBIOLOGIA, HIGIENE E QUALIDADE DO PESCADO**. 1<sup>a</sup>. ed. São Paulo: Varela, [s. l.], v. 1, 2004.

WABNITZ, C. *et al.* **From Ocean to Aquarium: The global trade in marine ornamental species**. 1<sup>a</sup>. ed. Cambridge: UNEP World Conservation Monitoring Centre, 2003.

YANONG, R. P. E. **Use of Antibiotics in Ornamental Fish Aquaculture**. University of Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Science. Ruskin, p. 1-7. 2003.

ZMYSLOWSKA, I. *et al.* Occurrence of bacteria in water and in vendace (*Coregonus albula*) during rearing in tanks. **Polish Journal of Environmental Studies**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 51-56, 2001.