



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ – UFC
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR – LABOMAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS**

**MONITORAMENTO DA MICROBIOTA BACTERIANA DA ÁGUA EM UM
SISTEMA FECHADO DE CULTIVO EM UMA ESTAÇÃO DE PISCICULTURA
MARINHA**

RICARDO ALBUQUERQUE REBOUÇAS

**FORTALEZA
2010**

MONITORAMENTO DA MICROBIOTA BACTERIANA DA ÁGUA EM UM SISTEMA FECHADO DE CULTIVO EM UMA ESTAÇÃO DE PISCICULTURA MARINHA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, COMO REQUISITO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS.

**FORTALEZA
2010**

R242 Rebouças, Ricardo Albuquerque

Monitoramento da microbiota bacteriana da água em um sistema fechado de cultivo em uma estação de piscicultura marinha / Ricardo Albuquerque
Rebouças, 2010.

79f.; il. color. enc.

Orientadora : Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa

Co-orientadora: Profa. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira

Área de concentração: Microbiologia Ambiental

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR), Fortaleza, 2010.

1.Efluente 2.bactérias 3.antimicrobianos 4.biofiltro 5.peixes I. Sousa,
Oscarina Viana (orient) II. Vieira, Regine Helena Silva dos Fernandes
(co-orientadora)

III. Universidade Federal do Ceará – Curso de Mestrado em Ciências
Marinhas tropicais. IV. Título

CDD 579

Após a finalização dos trabalhos da defesa de Dissertação de Mestrado do aluno **Ricardo Albuquerque Rebouças**, intitulada “**Monitoramento da microbiota bacteriana da água em um sistema fechado de cultivo em uma estação de piscicultura marinha**”, a Banca Examinadora considerando o conteúdo do trabalho e a apresentação realizada considera a **DISSERTAÇÃO APROVADA**.

Dissertação aprovada em ___/___/___

Profª. Dra. OSCARINA VIANA DE SOUSA

Orientadora

Profª. Dra. REGINE HELENA SILVA DOS FERNANDES VIEIRA

Co-orientadora

Profª. Dra. CLÁUDIA MIRANDA MARTINS

Membro

DEDICO

A minha mãe que sempre acreditou em mim e deu total apoio em todas as minhas decisões e ao meu pai (em memória) por estar sempre me mostrando o melhor caminho. A toda minha família por sempre torcer por mim. Aos meus amigos que sempre deram atenção nas horas que precisei.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre me iluminando e dando forças para eu continuar.

À minha mãe por me apoiar nas minhas decisões, por ter ajudado em todas as horas que eu mais precisei e pela melhor pessoa do mundo que ela é para mim. Ao meu pai (em memória) que está sempre iluminando os meus caminhos.

À minha sobrinha Cinthya que me ajudou nessa dissertação também, às minhas irmãs, os meus sobrinhos e a toda minha família que sempre acreditou em mim.

À professora Regine Vieira (pessoa de muitas virtudes) que aceitou ser minha Co-orientadora e me permitiu o uso de seu laboratório para a execução das análises dos meus experimentos.

À professora Oscarina Viana por ter me orientado. Sempre atenciosa e muito paciente. O pouco que sei de microbiologia devo a esta pessoa maravilhosa e de muito bom coração, pois aprendi muito com ela.

Às professoras Regine e Cristina, ao Max e a Rachel por ajudarem a iluminar o meu caminho conseguindo assim a orientação da professora Oscarina.

À professora Cláudia Martins por ter participado da minha banca examinadora e ter contribuído com o enobrecimento dessa pesquisa.

Às minhas amigas Edirsana, Cristiane e Gleire que sempre estiveram dispostas a me ajudar, por mais que eu tenha sido inexorável para aceitar, mas elas não desistiram e acabaram me ajudando muito durante esta dissertação. Muito obrigado minhas amigas.

À Morgana que ajudou muito nesse trabalho incansavelmente.

A todos os componentes do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado por sempre me auxiliarem nas horas que precisei.

Ao Lula, Otávio, Elthon, Sérgio, Rodrigo e a todos os meus amigos que sempre me deram força nessa luta.

Ao coordenador do Centro de Estudos Ambientais Costeiros professor Alberto Nunes e aos responsáveis pela piscicultura marinha Tarcísio e Lula pela oportunidade de fazer minhas coletas nesse local.

Ao Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR-UFC) pela oportunidade de fazer a Pós – graduação em Ciências Marinhas Tropicais.

À coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior – CAPES pela a concessão da bolsa de estudo no curso.

RESUMO

O desenvolvimento de cultivos eficientes utilizando sistemas fechados de cultivo com recirculação de água é necessário para uma aqüicultura sustentável. Esta pesquisa visou quantificar, identificar grupos bacterianos e realizar antibiograma das espécies do gênero *Vibrio* presentes na água de recirculação usada para cultivo em uma estação de piscicultura marinha experimental. As amostras de água foram coletadas do sistema de cultivo no período entre setembro de 2007 e maio de 2008, perfazendo um total de 8 coletas envolvendo o período de chuva e estiagem. Os parâmetros ambientais ficaram dentro dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira. Os números mais prováveis (NMP) de coliformes totais e termotolerantes variaram em P1 e P6, respectivamente: (P1) de $<1,8$ a $3,4 \times 10^2$ e de $<1,8$ a $2,2 \times 10^2$; e (P6) de $<1,8$ a $6,8 \times 10$ e de $<1,8$ a $2,2 \times 10^2$. Os resultados das Contagens Padrão em Placa (CPP) das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mililitro das bactérias heterotróficas entre os pontos oscilaram de <10 a $1,31 \times 10^5$. As contagens das bactérias nitrificantes nos pontos variaram de <10 a $2,5 \times 10^7$ UFC/mL. O número de colônias de *Vibrio* em P1, P2 e P6 oscilou de <10 a $2,37 \times 10^4$ UFC/mL. Foram identificadas 40 cepas das 51 isoladas de amostras de água entre as bactérias heterotróficas. Estas se mostraram pertencentes a 13 gêneros distintos, sendo *Aeromonas*, *Leuconostoc* e *Vibrio* as mais freqüentes. As culturas com capacidade de nitrificação provindas de amostras de água se distribuíram em 8 gêneros diferentes, sendo encontrados com maior freqüência *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Paracoccus* e *Vibrio*. Em Ágar Tiosulfato Citrato Bile-Sacarose (TCBS) foram isoladas e identificadas espécies da família Vibrionaceae. Dos 28 isolados das amostras de água foram identificadas 20 estirpes. As estirpes identificadas pertenciam a 10 diferentes espécies, *V. coralliilyticus*, *V. metschnikovii* e *V. orientalis*, tiveram maior freqüência. Os isolados identificados foram submetidos a antibiograma. Todas as cepas foram sensíveis ao sulfazotrim, ao cloranfenicol, a estreptomina, oxitetraciclina, e a nitrofurantoina. Entre a microbiota de víbrios da água no sistema foram encontrados 40% das estirpes sendo resistentes ao ácido nalidíxico, 30% a cefotaxima e a ampicilina, 5% ao florfenicol, a tetraciclina, a cefalotina e a gentamicina. O perfil mais freqüente de resistência dos isolados foi o CTX-NAL (44,5%) (4/9). Do total de estirpes isoladas, nove (45%) (9/20) se mostraram com um perfil de resistência múltipla a seis classes diferentes de antimicrobianos. Foi observada nessa pesquisa a resistência aos antimicrobianos: cefotaxima, ácido nalidíxico, gentamicina, cefalotina, ciprofloxacino, ampicilina, tetraciclina e florfenicol, podendo estar relacionada à característica plasmidial. Estudos sobre a diversidade da microbiota com particular atenção às populações de *Vibrio* nesses ambientes são de extrema importância para a avaliação da extensão da gravidade em eventos de doenças bacterianas. Pesquisas sobre bactérias nitrificantes entre a população de bactérias heterotróficas dentro do sistema de cultivo de organismos marinhos são importantes para estabelecer os parâmetros biológicos e garantir a sustentabilidade do cultivo.

Palavras – Chave: Efluente, bactérias, antimicrobianos, biofiltro, peixes.

ABSTRACT

Sustainable aquaculture requires a closed-loop water circulation system. The objective of this study was to identify and quantify vibrio species in water samples from an experimental marine fish farm and submit them to antibiogram testing. Eight samples were collected monthly at 6 locations (P1 through P6) between September 2007 and May 2008, covering both the rainy and the dry season. The environmental parameters were within the ranges established by Brazilian legislation. Variation in the most probable number (MPN) of total and thermotolerant coliforms was greatest at P1 and P6: $<1.8\text{--}3.4 \times 10^2$ and $<1.8\text{--}2.2 \times 10^2$ for P1, and $<1.8\text{--}6.8 \times 10$ and $<1.8\text{--}2.2 \times 10^2$ for P6, respectively. Standard plate counts ranged from <10 to 1.31×10^5 CFU/mL for heterotrophic bacteria, and from <10 to 2.5×10^7 UFC/mL for nitrifying bacteria. The number of vibrio colonies was $<10\text{--}2.37 \times 10^4$ UFC/mL at P1, P2 and P6. The heterotrophic strains identified (41/50) belonged to 13 genera, the most frequent of which were *Aeromonas*, *Leuconostoc* and *Vibrio*. The nitrifying bacteria identified belonged to 8 genera, the most frequent of which were *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Paracoccus* and *Vibrio*. *Vibrio* species were isolated in thiosulfate citrate bile sucrose (TCBS) agar and identified. In 28 isolates, 20 lineages were found belonging to 10 different species, the most frequent of which were *V. coralliilyticus*, *V. metschnikovii* and *V. orientalis*. All vibrio strains were susceptible to sulfamethoxazol-trimetoprim, chloramphenicol, streptomycin, oxytetracycline and nitrofurantoin, but 40% were resistant to nalidixic acid, 30% to cefotaxime and ampicillin, and 5% to florfenicol, tetracycline, cefalotin and gentamycin. The most frequently observed resistance profile was cefotaxime-nalidixic acid (4/9; 44.5%). Resistance to multiple antibiotics (6 classes) was observed in 9/20 (45%) vibrio strains. The observed resistance to antibiotics (cefotaxime, nalidixic acid, gentamycin, cefalotin, ciprofloxacin, ampicillin, tetracycline and florfenicol) may be related to plasmid DNA. Studies on bacterial diversity in aquaculture environments, especially with regard to vibrios, play an important role in the assessment of the severity of bacterial infections in livestock. Studies on nitrifying bacteria among heterotrophic populations can help establish biological parameters and ensure sustainability in marine fish farming.

Key words: effluents; bacteria; antibiotics; biofilter; fish.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Produção brasileira proveniente da pesca e da aquicultura de 1998 a 2007 (IBAMA, 2007).....	4
FIGURA 2 – Sistema Fechado de Tratamento de Água da Estação de Piscicultura Marinha do CEAC-LABOMAR.....	20
FIGURA 3 – 1 Afluente (Rio Pacoti), 2 Tanque de desinfecção, 3 Tanque de decomposição aeróbia, 4 Filtro biológico, 5 Tanque de recirculação, 6 Tanque de cultivo.	22
FIGURA 4 - Esquema de análise para contagem de coliformes totais/termotolerantes das amostras de água de um sistema fechado de cultivo de peixes marinhos.	23
FIGURA 5 - Esquema de análise para contagem das bactérias do grupo das heterotróficas totais das amostras de água de um sistema fechado de cultivo de peixes marinhos.	25
FIGURA 6 - Esquema de análise para contagem das bactérias do grupo das nitrificantes das amostras de água de um sistema fechado de cultivo de peixes marinhos.	26
FIGURA 7 - Esquema de análise para contagem dos vibrios das amostras de água de um sistema fechado de cultivo de peixes marinhos.	27
FIGURA 8 - Esquema de antibiograma das espécies bacterianas isoladas da família Vibrionaceae das amostras de água de um sistema fechado de cultivo de peixes marinhos. .	31
FIGURA 9 - Esquema do procedimento de cura plasmidial, ao qual foram submetidas as estirpes bacterianas com perfil de resistência aos antimicrobianos testados.	32
FIGURA 10 – Logaritmo dos valores de bactérias heterotróficas totais (BHT), bactérias nitrificantes (NIT) e vibrios (VIB) da água do sistema fechado de cultivo de peixes marinhos, expressas em unidades formadoras de colônias por mililitro de amostra (UFC/mL).....	42
FIGURA 11 – Percentual de espécies de bactérias heterotróficas totais identificadas do sistema fechado de cultivo de peixes marinhos.	45
FIGURA 12 – Percentual de espécies de bactérias nitrificantes identificadas do sistema fechado de cultivo de peixes marinhos.	48
FIGURA 13 – Percentual de isolamento de bactérias pertencentes à família Vibrionaceae dentro do sistema de cultivo de peixes marinhos.	50
FIGURA 14 – Perfil de sensibilidade/resistência das cepas da família Vibrionaceae isoladas do sistema de cultivo de peixes marinhos.	54

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Consumo de água em sistemas de produção aquícola e sistemas de produção industrial e agropecuária com os respectivos valores do produto e de água.	9
---	---

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** – Valores médios e desvio padrão dos parâmetros físico-químicos da água dentro do sistema fechado de cultivo de peixes marinhos registrados no momento das coletas. 33
- TABELA 2** – Resultados do monitoramento de coliformes totais e termotolerantes na água em um sistema fechado de cultivo de peixes marinhos. 36
- TABELA 3** – Quantificação de bactérias heterotróficas totais, bactérias nitrificantes e vibrios em um sistema fechado de cultivo de peixes marinhos, expressas em unidades formadoras de colônias por mililitro de amostra (UFC/mL). 39
- TABELA 4** - Identificação de estirpes bacterianas pertencentes ao grupo das heterotróficas totais isoladas sobre meio ágar PCA inoculado com amostras de água de um sistema fechado de cultivo de peixes marinhos. 43
- TABELA 5** – Identificação de estirpes bacterianas pertencentes ao grupo das nitrificantes isoladas sobre meio para nitrificantes inoculado com amostras de água de um sistema fechado de cultivo de peixes marinhos. 46
- TABELA 6** – Identificação de estirpes bacterianas da família Vibrionaceae isoladas sobre meio seletivo para vibrios (ágar TCBS) inoculado com amostras de água de um sistema fechado de cultivo de peixes marinhos. 48
- TABELA 7** – Padrão de comportamento frente a antimicrobianos em bactérias da família Vibrionacea isoladas em amostras de água de um sistema fechado de cultivo de peixes marinhos. 52
- TABELA 8** – Perfil de multi-resistência dos isolados bacterianos de um sistema fechado de cultivo de peixes marinhos. 55
- TABELA 9** – Comportamento dos isolados bacterianos de um sistema fechado de cultivo de peixes marinhos com perfil de resistência submetidos à técnica de cura de plasmídeo. 57

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	1
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 – Aquicultura	4
2.2 – Piscicultura marinha	6
2.3 - Características dos efluentes da aquicultura marinha e impacto sobre os ambientes aquáticos receptores	7
2.4 - Tecnologias alternativas de cultivo	10
2.5 - Principais grupos bacterianos da microbiota em ambientes aquáticos marinhos de cultivo de peixe	12
2.5.1 - Bactérias heterotróficas	12
2.5.2 – <i>Vibrio</i>	12
2.5.3 – Coliformes	14
2.6 – Uso de antimicrobianos na aquicultura	15
2.7 - Microrganismos com potencial para uso na melhoria das condições ambientais da água de cultivo	16
2.7.1 - Bactérias nitrificantes	17
3 - OBJETIVOS	19
3.1 - Objetivo Geral	19
3.2 - Objetivos específicos	19
4 - MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 - Descrição dos pontos de coleta	20
4.1.1 – Descrição do Sistema	21
4.1.2 – Coleta das amostras	21
4.1.3 – Análises físico-químicas	22
4.2 - Análises Microbiológicas	23
4.2.1 - Processamento das amostras de água	23
4.2.2 – Avaliação da qualidade bacteriológica das águas da estação de cultivo	23
4.2.3 – Quantificação de grupos bacterianos.....	24
4.2.4 – Contagem de Bactérias Nitrificantes Totais	25
4.2.5 – Contagem de <i>Vibrio spp</i>	26

4.2.6 – Isolamento e Identificação das estirpes bacterianas	28
4.2.6.1 – Bactérias Heterotróficas Totais	28
4.2.6.2 – Bactérias Nitrificantes Totais	28
4.2.6.3 - <i>Vibrio spp</i>	29
4.2.7 – Teste de Antibiograma das estirpes isoladas da família Vibrionaceae.....	29
4.2.7.1 – Cura Plamidial	31
4.3– Análise dos Resultados	32
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
6– CONCLUSÕES	59
7 - CONSIDERAÇÃO FINAL	60
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1 – INTRODUÇÃO

O pescado é uma importante parte da dieta diária de muitos países, contribuindo com um quarto da oferta mundial de proteína de origem animal. Na maioria dos países, o pescado é uma fonte relevante de emprego, lucro e divisas (JOSUPEIT, 2004), tendo apresentado um crescimento mundial no consumo *per capita* de 11,6 kg em 1971 para 15,7 kg em 1997, principalmente devido aos países em desenvolvimento (DELGADO *et al.*, 2003). No ano de 2006, esse consumo de peixes chegou a uma média de 16,7kg (FAO, 2008).

Por outro lado, o crescimento da oferta dessa fonte de proteína resulta em uma condição de super exploração dos estoques pesqueiros naturais. Essa situação de exploração indiscriminada dos estoques juntamente com a crescente diferença entre a quantidade de pescado capturado e a demanda de consumo fez com que a aquicultura se tornasse uma das alternativas mais viáveis no mundo para produção de alimento de alto valor protéico para consumo humano (CAMARGO; POUHEY, 2005).

A Organização Mundial para a Agricultura e Alimentação (FAO, 1990) definiu aquicultura como “o cultivo de organismos aquáticos, incluindo peixes, crustáceos, moluscos e plantas”. A aquicultura se firmou como atividade econômica no cenário nacional da produção de alimentos a partir de 1990, época em que a produção anual de pescado cultivado girava em torno de 25.000 toneladas. Desde então, os diversos segmentos do setor têm se desenvolvido progressivamente, de tal forma que, em 2000 foram produzidas cerca de 150 mil toneladas de pescado (IBGE, 2001), já em 2002 a produção foi de 251 mil toneladas (IBAMA, 2004). A produção aquícola mundial continuou crescendo, chegando a 110 milhões de toneladas em 2006 (FAO, 2008).

A produção total de pescado no Brasil em 2002 foi de 1.006.869,0 toneladas, sendo 419.588,5 (42%) toneladas em águas continentais e 587.280,5 (58%) toneladas em águas marinhas, apresentando um incremento de 7,1% em relação a 2001, determinado principalmente pelo desempenho da aquicultura. O cultivo continental apresentou no ano de 2001 uma produção de 156.532,0 toneladas (IBAMA, 2003) e 180.173,0 toneladas em 2002 (IBAMA, 2004), correspondendo a um incremento de 15,1%, sendo que essa produção responde por 17,9% do total.

A necessidade mundial de expansão das atividades da aquicultura tem como um dos principais obstáculos a qualidade das águas costeiras e estuarinas. A contaminação dos corpos d'água pela presença de descargas de esgoto doméstico após tratamento ineficaz ou até

mesmo na ausência deste, compromete a qualidade da água e do pescado produzido (SMITH, 1996).

A qualidade microbiológica da água na aquicultura influencia na qualidade microbiológica do peixe e de seus produtos. Esses alimentos têm sido associados a doenças humanas e são veículo de transmissão de microrganismos patogênicos e intoxicações, constituindo-se em problema de saúde pública. Por exemplo, os coliformes apontam a possibilidade da presença de poluição fecal uma vez que são microrganismos que ocorrem em grande número na microbiota intestinal humana ou de animais homeotérmicos. Os coliformes não são habitantes normais da microbiota intestinal dos peixes, no entanto, eles têm sido isolados do trato gastrintestinal desses animais. Esse fato indica que a microbiota bacteriana dos organismos aquáticos pode revelar as condições microbiológicas da água onde estes se encontram (PAL; DASGUPTA, 1992).

O descarte de efluentes industriais sem tratamento, incluindo os das próprias fazendas aquícolas, também afeta a qualidade do ecossistema receptor causando principalmente a eutrofização dessas águas. Os parâmetros físico-químicos e biológicos da água que estão diretamente relacionados com a sua qualidade afetam a sobrevivência, reprodução, crescimento, produção ou manejo de peixes, quando não encontrados em níveis ideais (MELO, 1999).

O modelo atual de cultivo de organismos aquáticos marinhos resulta em degradação de áreas alagadas, poluição pontual da água e problemas de salinização (PHILLIPS; MACINTOSH, 1997). Áreas com elevada densidade de viveiros onde acontece recirculação de poluentes químicos e biológicos entre as fazendas, também apresentam problemas de autopoluição e transmissão de doenças (SMITH, 1996). Xuea, Honga e Charlesb (2004) chamaram a atenção para o fato da qualidade da água e o controle de doenças serem interdependentes e estarem ligados à atividade microbiana nos sistemas de aquicultura.

Com o intuito de minimizar os impactos gerados pelos efluentes da aquicultura e garantir a sustentabilidade da atividade, modelos alternativos de cultivo de organismos marinhos tem sido propostos. O desenvolvimento de sistemas de cultivos eficientes que melhorem o aproveitamento da água e mitiguem possíveis impactos é necessário. Com isso a utilização de sistemas fechados com recirculação de água vem se tornando uma das alternativas para a aquicultura sustentável (COLT *et al.*, 2006; GUTIERREZ-WING; MALONE, 2006).

No sistema fechado de tratamento de água, embora periodicamente possa haver uma troca parcial ou mesmo total da água do sistema, é inevitável o acúmulo de resíduos orgânicos

e metabólicos. Unidades de filtração mecânica, biológica e aeradores são instalados em série para remover os sólidos da água, promover a redução microbiológica da amônia e do nitrito (substâncias tóxicas aos peixes) em nitratos, repor o oxigênio consumido e eliminar o excesso de gás carbônico acumulado na água do sistema. Conseqüentemente, uma menor quantidade dos efluentes descartados para o ambiente, sendo primeiramente tratados, diminuindo assim impactos sobre o ambiente provenientes do cultivo destes organismos (PIEDRAHITA, 2003).

Dentro desse tipo de sistema, os biofiltros são empregados com o intuito de minimizar a eutrofização da água de cultivo, removendo a matéria orgânica e inorgânica com grande concentração de compostos nitrogenados. Isto resulta na manutenção da qualidade química da água proporcionando um cultivo mais saudável, uma água com qualidade e tendo um menor impacto ambiental (AVNIMELECH, 1998).

Um componente fundamental de um biofiltro é a formação do biofilme composto por microrganismos que se fixam e se estabelecem sobre a superfície submersa. Em pesquisa realizada por Thompson, Abreu e Wasielesky (2002) foi analisada a eficiência do biofilme na manutenção da qualidade da água em tanques para o cultivo de organismos aquáticos. Os autores correlacionaram a taxa de concentração da amônia, com a eficiência do sistema principalmente a absorção deste elemento pelas microalgas e cianobactérias presentes no biofilme. Foi verificada a presença de nitrato, composto nitrogenado menos tóxico, nos tanques de cultivo, após a redução da amônia confirmando que as bactérias nitrificantes presentes no sistema desempenham um papel importante na manutenção da qualidade dessa água de cultivo.

Os microrganismos presentes no biofilme além de influenciarem positivamente na qualidade da água podem ser muito importantes como fonte de alimento para os organismos cultivados e no controle de doenças (ABREU, 1994). Pouco se sabe sobre a estrutura da comunidade de bactérias que compõem o biofilme. O grande entrave para essa compreensão tem sido a dificuldade na identificação das bactérias, devido às técnicas convencionais utilizadas.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Aqüicultura

A produção de pescado no período de 1998 a 2007 (Figura 1) apresentou um comportamento de declínio; em 1998 de 85,4% contra 73% em 2007. Em contrapartida, a aqüicultura apresentou um comportamento de crescimento ao longo de todo o período, registrando uma participação de 14,6% em 1998, contra 27% em 2007 (IBAMA, 2007).

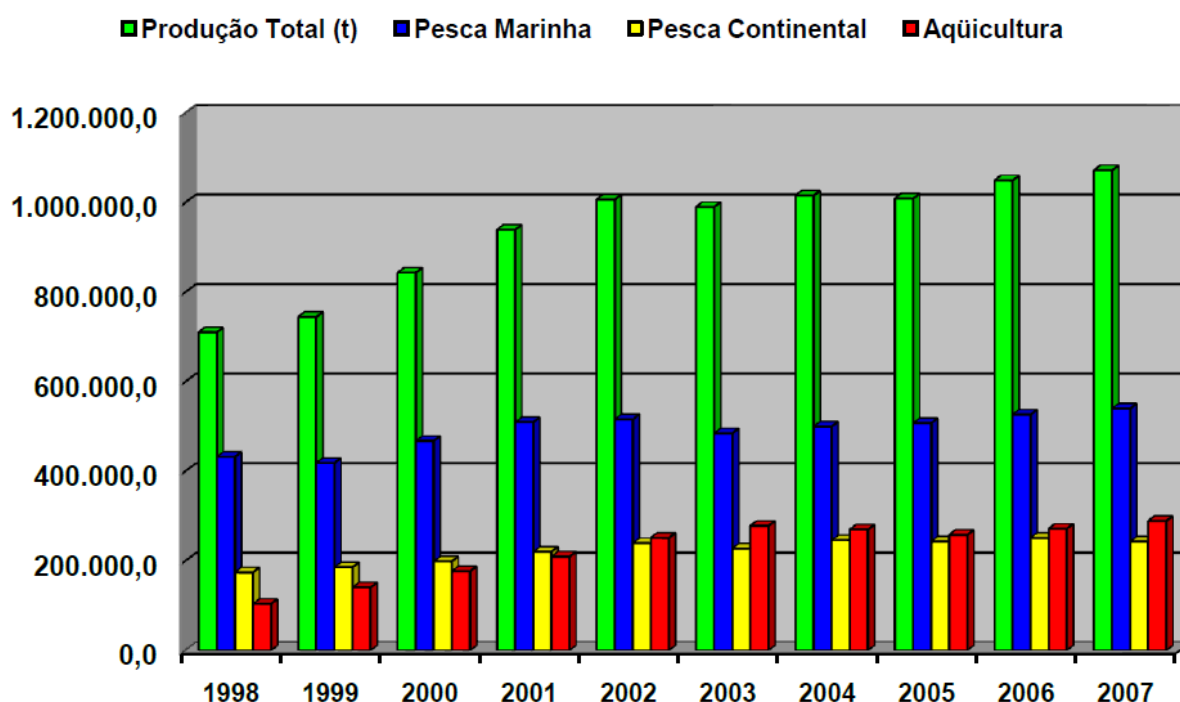


Figura 1 - Produção brasileira proveniente da pesca e da aqüicultura de 1998 a 2007 (IBAMA, 2007).

A partir de 1950, três fatores modificaram intensamente a fisionomia da aqüicultura: modernização dos meios de comunicação e de transporte, aperfeiçoamento da reprodução artificial e progresso no campo da nutrição, com o desenvolvimento dos alimentos balanceados. Os atuais avanços que estão sendo conquistados na área da genética poderão em pouco tempo, possibilitar o aumento do número de espécies aquáticas cultivadas (CAMARGO; POUHEY, 2005).

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO), a produção mundial de pescados em 2007, envolvendo a produção extrativa (91,1 milhões de toneladas) e da aqüicultura (61,1 milhões de toneladas), foi de 152,2 milhões de toneladas. Desse total, estima-se que cerca de 85% (129,4 milhões de toneladas) se destinaram ao consumo humano, enquanto 15% (22,8 milhões de toneladas) foram utilizadas para a

fabricação de farinhas, óleos e outros subprodutos (FAO, 2008). Comparando o crescimento médio anual da aqüicultura (6,5%) de 1997 a 2007 com o incremento registrado da produção extrativista (27%) no mesmo período, tem-se uma grande probabilidade da produção proveniente da aqüicultura ultrapassar a produção advinda da pesca extrativa até 2013 (ROCHA; ROCHA, 2010).

A origem da produção oriunda da aqüicultura em 2007 evidencia a destacada hegemonia do Continente Asiático, cuja participação correspondeu a 91,11 % da produção mundial dessa atividade. Na seqüência, com bem menos representatividade, aparecem a Europa, com 3,59%, América do Sul, com 1,96%, América do Norte e Central, com 1,80%, África, com 1,27% e a Oceania, com 0,26%. A composição da produção mundial desse setor mostra quatro grandes grupos de espécies, das quais, a piscicultura se destaca de forma preponderante (48,98%), tendo em segundo e terceiro lugar, praticamente com a mesma participação relativa, as plantas aquáticas (22,79%) e os moluscos (20,05%), seguidos pelos crustáceos (7,50%) e outros organismos aquáticos (0,68%) (FAO, 2008).

A produção de pescados do Brasil encontra-se praticamente estagnada, especialmente quando se considera que o crescimento apresentado por esse setor entre 2003 (990.272 toneladas) e 2007 (1.072.226 toneladas), correspondeu a um incremento médio anual de apenas 20.488 toneladas, ou seja, apresentou um crescimento não condizente com o seu elevado potencial de exploração (ROCHA; ROCHA, 2010).

O Brasil vem se destacando como um dos países de maior potencial para a expansão da aqüicultura, devido à demanda mundial por alimentos de origem aquática, não apenas em função da expansão populacional, mas também pela preferência por alimentos mais saudáveis (VALENTI *et al.*, 2000). Vale ressaltar que o Brasil possui 8.500 km de costa, um clima extremamente favorável para o crescimento dos organismos cultivados, terras disponíveis, mão-de-obra abundante e crescente demanda por pescado no mercado interno (DIEGUES, 2006).

A aqüicultura no Brasil tem se caracterizado como atividade promissora, sendo a principal responsável pelo superávit na balança comercial de pescado brasileiro. No período de 1990-2001 este setor cresceu aproximadamente 925%, enquanto a aqüicultura mundial teve um crescimento de 187% no mesmo período (BORGHETTI; OSTRENSKY; BORGHETTI, 2003). O Brasil ocupa a décima oitava posição mundial entre os produtores de pescado cultivado (FAO, 2008).

A composição da produção da aqüicultura brasileira em 2007, a exemplo da aqüicultura mundial, foi majoritariamente formada por: peixes (72,59%), exclusivamente

representados pela piscicultura de água doce (209.812 t); pelos crustáceos (22,57%), cuja carcinicultura marinha, dominada totalmente pelo camarão *Litopenaeus vannamei* participou com 65.000 t, enquanto que o camarão de água doce (*Macrobrachium rosenbergii*) contribuiu com apenas 230 t; por moluscos (4,64%) representados por mexilhões e ostras e, por répteis e anfíbios (0,21%), representados basicamente por jacarés e rãs (ROCHA; ROCHA, 2010).

A aquicultura interage com o meio ambiente, utilizando seus recursos e provocando mudanças ambientais. Grande parte destas interações ambientais tem efeitos positivos fundamentalmente sócio-econômicos e são numerosos os interesses derivados de sua expansão. Existe o reconhecimento de que os procedimentos “artesaniais” realizados até poucos anos atrás, resultaram em um efeito mínimo sobre os ecossistemas, quando comparados a outras atividades extrativistas ou industriais. No entanto, o crescimento desordenado da aqüicultura, nos últimos anos, tem provocado numerosas críticas. Alguns exemplos de degradação ambiental nas zonas costeiras foram associados às operações de cultivo intensivo de salmão em gaiolas no Norte da Europa e Chile, e outros referentes às práticas de cultivo de crustáceos no sudeste asiático e na América Latina, vinculadas ao ecossistema de manguezal (BARG, 1994).

Atualmente a aquicultura nacional se encontra em uma situação de crescimento com características industriais, porém com poucos investimentos em inovações tecnológicas que proporcionem a melhoria na qualidade da água descartada. Segundo Pillary (1992), é necessário o desenvolvimento e implantação de técnicas para o tratamento dos efluentes gerados pela aquicultura, de forma a minimizar os impactos sobre o meio ambiente e prevenir as doenças nos cultivos, o que resulta em perdas econômicas e de qualidade.

2.2 – Piscicultura marinha

Em alguns países, tais como Portugal, o cultivo de peixes marinhos já é desenvolvido em viveiros semelhantes aos utilizados na carcinicultura. Este tipo de cultivo pode tornar-se uma realidade futura para a maioria dos países devido aos elevados custos do cultivo em alto mar e à sobrepesca de algumas espécies importantes comercialmente. Baseado nessa realidade é de extrema importância desenvolver e implantar técnicas de cultivo que minimizem o impacto sobre o ambiente tornando os investimentos sustentáveis, podendo gerar empregos, renda e desenvolvimento para as regiões onde forem implantados (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

O cultivo de peixes marinhos está bem desenvolvido no sudeste asiático, na costa do Mediterrâneo e nos Estados Unidos, porém no Brasil encontra-se em fase de pesquisa. Não

existe ainda registro comercial de peixes marinhos cultivados, porém a região sul/sudeste brasileira destaca-se por possuir trabalhos experimentais sobre o cultivo de tainha (*Mugil platanus*). No Instituto de Pesca de São Paulo são desenvolvidos trabalhos relacionados à produção dos alevinos de robalo (*Centropomus parallelus*) e na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) de linguado (*Paralichthys orbignianus*). Outra Universidade com trabalho pioneiro nessa área é a Fundação Universidade do Rio Grande (FURG) que estuda várias espécies, dentre elas: o linguado, a tainha, a corvina (*Micropogonias furnieri*), o pampo (*Trachinotus marginatus*) e o peixe-rei (*Odontesthes argentinensis*) (SAMPAIO, 2000). Estão sendo realizados pelo Centro de Estudos Ambientais Costeiros (CEAC), pertencente ao Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, estudos na área de piscicultura marinha das seguintes espécies: cioba (*Lutjanus analis*), ariacó (*Lutjanus singris*), dentão (*Lutjanus jocu*), guaiúba (*Ocyurus chrysurus*) e o robalo (*Centropomus spp*).

A piscicultura marinha no Brasil contribui com uma porção insignificante na produção mundial, sendo ainda pontuais e improvisadas as tentativas de criação em escala comercial. Apesar das excelentes condições naturais, abundância de recursos hídricos e presença de peixes marinhos com extraordinário potencial para a aqüicultura, essa atividade no Brasil ainda não foi disseminada (MILLER, 2003).

Mesmo nessa etapa experimental de implantação, a qualidade da água figura como uma das principais preocupações para a piscicultura marinha. A água é um recurso natural renovável, mas com reservas limitadas. É imprescindível à civilização humana, mas tem sido utilizada de forma inadequada e sua demanda crescente pode fazer com que se torne, em breve, um recurso extremamente limitado em quantidade e qualidade. Em análise da evolução do uso nos últimos 100 anos, Telles (2002) afirma que “na média mundial, cerca de 70% da água hoje disponível são destinados ao aproveitamento agrícola”. Segundo este autor, aproximadamente 20% da água é destinado à indústria, e menos de 10% ao abastecimento da população.

2.3 - Características dos efluentes da aquicultura marinha e impacto sobre os ambientes aquáticos receptores

Nos efluentes provenientes da aqüicultura são encontrados uma grande quantidade de sólidos orgânicos suspensos, carbono, nitrogênio e fósforo, podendo levar a um aumento significativo na descarga de nutrientes em ambientes costeiros (PÁEZ-OSUNA *et al.*, 1997).

Em cada local os efeitos do aporte de nutrientes são distintos, dependendo das características biológicas e físico-químicas do ambiente receptor (HUANG, 1997).

No ambiente aquático natural os impactos estão associados ao aumento da biomassa de fitoplâncton, ou seja, a eutrofização. Nos cultivos a quantidade de compostos orgânicos é maior, em relação ao ambiente natural, pois existe uma grande quantidade de resíduos de ração, fezes e o uso de fertilizantes entre outros. Os microrganismos decompõem estes resíduos e os reduzem para a forma inorgânica (NH_3 , H_2S , CO_2 , etc) utilizando o processo de mineralização (MORIARTY, 1997).

Os microrganismos no ambiente aquático não apenas ajudam na produção e degradação da matéria orgânica, como também reciclam os nutrientes. O ciclo do nitrogênio desempenha um importante papel na reciclagem do material orgânico através dos processos de: fixação, amonificação, nitrificação e desnitrificação do nitrogênio, sendo realizado por diferentes microrganismos (ABRAHAM *et al.*, 2004).

Os impactos causados pela aquicultura podem ser classificados como interno, local ou regional. Os internos são impactos que interferem no sistema de criação, como por exemplo, a redução de oxigênio dissolvido nos viveiros. Já os impactos locais se estendem a um quilômetro à jusante da descarga dos efluentes. Os efeitos nos ambientes aquáticos, num raio de vários quilômetros, são considerados impactos regionais (SILVERT, 1992).

Os impactos principais causados pelos efluentes das atividades de aquicultura sobre os ecossistemas aquáticos são: o aumento das concentrações de nitrogênio e fósforo na coluna d'água e o acúmulo de matéria orgânica nos sedimentos. Essa disponibilidade de nutrientes nos ambientes tende a favorecer o aumento da comunidade fitoplanctônica, alterando a dinâmica do oxigênio dissolvido. Durante o dia, a atividade fotossintética proporciona o acréscimo de oxigênio, que ao ultrapassar o equilíbrio de saturação pode ocasionar embolia gasosa nos organismos aquáticos. Por outro lado, durante a noite e no início da manhã o elevado consumo de oxigênio pelo fitoplâncton pode ocasionar a morte da maioria dos organismos pela ausência desse gás (MIDLEN; REDDING, 1998).

Nos efluentes, o nitrogênio das atividades de aquicultura provém, principalmente, da proteína das rações, sendo que parte é excretada pelos organismos na forma de amônia, enquanto o restante é eliminado pelas fezes na forma de nitrogênio orgânico (COCHAVA *et al.*, 1990).

É de fundamental importância que na implantação de qualquer sistema de cultivo, seja realizada, previamente uma avaliação quantitativa e qualitativa dos recursos hídricos

disponíveis. O fator quantitativo está relacionado ao volume de água necessário para suprir os viveiros durante todas as épocas do ano, e o qualitativo refere-se aos aspectos físico-químicos e bacteriológicos da água (PROENÇA; BITTENCOURT, 1994).

Existem diversas práticas de manejo em aqüicultura no Brasil que dependem da região e das condições climáticas locais. Na região sudeste é comum o uso de fluxo contínuo de água onde, a água de um viveiro é recirculada para o outro sem nenhum tratamento prévio, desaguando diretamente nos mananciais naturais (DELBIN; PATERNIANI, 1998). Essa prática pode acarretar, ao longo do tempo, em problemas como a eutrofização e a disseminação de doenças nos peixes cultivados, com conseqüente perda na produção.

Dados comparativos de uso e/ou consumo de água pela aqüicultura demonstram os grandes volumes necessários às práticas aquícolas (Quadro 1), e remetem à proposição de uma maior e melhor discussão dos tipos de ações de comando e controle necessários à gestão ambiental da aqüicultura.

Quadro 1 – Consumo de água em sistemas de produção aquícola e sistemas de produção industrial e agropecuária com os respectivos valores do produto e de água.

PRODUTO	ÁGUA USADA (m ³ /TM e m ³ / m ³)	VALOR NOMINAL DO PRODUTO (US\$)	VALOR DA ÁGUA (US\$/m ³)
Álcool	125-170	2.000/m ³	12-16
Papel	9-450	300/TM	0,7-33
Petróleo	21,6-810	500/m ³	0,6-23
Aço	8-250	200/TM	0,8-25
Algodão	90-450	1.000/TM	2,2-11
Criação de gado	42	2.000/TM	48
Criação de porco	54	2.000/TM	37
Aqüicultura			
Viveiros com camarões	11.000-55.000	6.000-12.000/TM	0,1-1,1
Salmonídeos	252.000	1.650-4.000/TM	0,006-0,018
Tanques com bagres (<i>Channel Catfish</i>)	6.470	1650/TM	0,25

m³: metro cúbico e TM: tonelada métrica

Fonte: Phillips, Beveridge e Clark (1991)

Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU) está previsto para o ano de 2025 a “Crise das Águas”, quando aproximadamente cinco bilhões de pessoas terão dificuldades para satisfazer suas necessidades de água e a metade enfrentará uma extrema escassez, caso não haja uma mudança nos padrões de consumo, uso e conservação dos mananciais. Por isso é imprescindível para diferentes atividades na aqüicultura reconhecer a devida importância da

principal fonte de recurso para o cultivo dos organismos aquáticos e encontrar alternativas para tornar essa atividade ecologicamente sustentável (FERREIRA, 2003).

A fim de racionalizar o uso da água assegurando à atual e às futuras gerações a necessária disponibilidade com a devida qualidade, foi editada a Lei n.º 9.433 de 08 de janeiro de 1997, que ficou conhecida como Lei das Águas (ANA, 1997). Dentre os instrumentos de gestão criados por essa lei, está a cobrança pelo uso da água, sendo este um dos instrumentos de gestão da Política Nacional de Recursos Hídricos mais discutidos. Devido às peculiaridades jurídicas relativas aos recursos hídricos no Brasil, a cobrança está apenas iniciando.

2.4 - Tecnologias alternativas de cultivo

Atualmente existem muitos sistemas de cultivo intensivo de organismos aquáticos, dentre os quais: os sistemas em tanques de concreto, em tanques-rede e em viveiros (POLI *et al.*, 2004).

Sistemas artificialmente projetados para utilizar plantas aquáticas (macrófitas) conhecidos como *Wetland* em substratos como areia, cascalhos ou outro material inerte, onde ocorre a proliferação de biofilmes que agregam populações variadas de microrganismos os quais, por meio de processos biológicos, químicos e físicos, tratam águas residuárias e podem ser utilizados também em tratamento de efluentes na aquicultura usando a ecotecnologia. (LIMA; TAVARES, 2008).

Os cultivos intensivos de organismos aquáticos, sem renovação de água e com biota predominantemente aeróbica e heterotrófica (ou em inglês, *Zero Exchange, Aerobic, Heterotrophic Culture Systems - ZEAH*) vêm surgindo como um novo paradigma na aquicultura mundial (EMERENCIANO *et al.*, 2007). Sistemas com baixa troca de água não só irão reduzir os custos com utilização de água e de bombeamento, como também reduzirão os custos com alimentação já que a produtividade natural é alta (GONZÁLEZ-FÉLIX *et al.*, 2007).

Uma tecnologia que pode representar um diferencial no impacto da atividade sobre o meio ambiente devido ao descarte das águas não tratadas é o sistema fechado de cultivo, com tratamento de água, que reduz a emissão de efluentes (PILLARY, 1992).

Os chamados “sistemas fechados” de tratamento de água direcionados para aquicultura se baseiam na recirculação da água dentro do cultivo, depois de passar por várias etapas de tratamento. Nesse sistema, a qualidade da água é monitorada utilizando parâmetros físico-

químicos e microbiológicos. São utilizados geralmente biofiltros colonizados por bactérias com capacidade de reduzir a quantidade de amônia na água, as chamadas “nitrificantes” (BRAZ FILHO, 2000).

Algumas etapas que podem ser aplicadas em um sistema fechado de tratamento de água são: bacia de sedimentação, tanque de desinfecção, filtro de areia, filtro de carvão ativado, filtro de tela/mecânico, filtração biológica, *skimmer* (fracionamento de proteínas) e ozônio /ultravioleta. O monitoramento dos sistemas de tratamento de água na aquicultura é imprescindível para avaliar a eficiência dos processos e permitir tomadas de decisão sobre melhoria ou alterações nos métodos empregados (BRAZ FILHO, 2000; NEDER *et al.*, 2000).

Um dos principais problemas em um sistema de produção de pescado com recirculação de água é a remoção dos resíduos sólidos. Este processo é necessário para evitar a obstrução do biofiltro, que poderá eliminar as bactérias nitrificantes e reduzir o fluxo de água. Os sólidos podem ser removidos por sedimentação ou por filtração mecânica. A origem das partículas em solução são os dejetos dos organismos cultivados e o alimento não consumido. A má digestão da ração pode estar relacionada com um alimento de baixa qualidade com alta percentagem de farelo, técnica de alimentação inadequada, superalimentação, alimento não apropriado para a fase ou espécie de organismo cultivado e dieta desbalanceada (BRAZ FILHO, 2000).

Dentre as vantagens proporcionadas por um sistema fechado de tratamento de água na aquicultura, pode-se enfatizar: o controle dos parâmetros físico-químicos, diminuindo assim o estresse dos organismos cultivados; menor vulnerabilidade dos organismos a doenças; altas densidades de estocagem, evitando uma maior exploração de áreas para cultivo; maior controle dos níveis de fósforo e nitrogênio na água; menor quantidade de água gasta num ciclo de cultivo, diminuindo assim os gastos com as taxas em relação ao uso da água e diminuição da descarga dos efluentes provenientes da aquicultura, conseqüentemente tendo-se um menor impacto ambiental (GONZÁLEZ-FÉLIX *et al.*, 2007).

Os impactos ambientais causados pela aquicultura de um país ou de uma região estão intimamente relacionados com o modelo de manejo e sistemas de produção adotados. O cultivo de peixes em um sistema fechado de tratamento de água é de vital importância para o sucesso e a conservação do meio ambiente (NEDER *et al.*, 2000).

2.5 - Principais grupos bacterianos da microbiota em ambientes aquáticos marinhos de cultivo de peixe

Segundo Magarinos *et al.* (2001), em águas temperadas uma carga máxima de bactérias é encontrada no ambiente aquático no verão e em ambientes altamente eutrofizados. Conseqüentemente, no inverno, com a deficiência de nutrientes na água ocorre o inverso. Nos viveiros de piscicultura essa condição é exacerbada nos meses de verão, onde os peixes continuamente vivem livremente em um "caldo bacteriano". São comumente encontradas na água de cultivo de peixes bactérias do gênero: *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* e *Vibrio* (ROBERTS; PALMEIRO; WEBER, 2009).

2.5.1 - Bactérias heterotróficas

As bactérias heterotróficas pertencem ao grupo das bactérias quimioorganotróficas, podem apresentar metabolismo tanto anaeróbico como aeróbico, realizando a decomposição de carboidratos, proteínas, ácidos orgânicos e álcoois, produzindo, sobretudo, NO_3^- e SO_4^- . Entre as aeróbias são encontradas algumas bactérias especializadas na decomposição de substratos complexos, como celulose, lignina, quitina e até petróleo. Dentro desse grupo encontramos alguns gêneros de bactérias conhecidos tais como: as *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Serratia* e *Mycobacterium* (SILVA; SOUZA, 1998). Segundo Michaud *et al.* (2006), a população bacteriana heterotrófica é suspeita de ter um efeito positivo contra bactérias patogênicas.

As bactérias redutoras de matéria orgânica são eficientes decompositoras em níveis baixos de pH, sendo ótimo entre 7,0 e 8,0, entretanto não são eficientes em níveis maiores. A desnitrificação heterotrófica influencia positivamente o pH da água (SOUSA; FORESTI, 1999).

2.5.2 – *Vibrio*

O gênero *Vibrio* é o maior dentro da família Vibrionaceae. Muitas espécies podem causar doenças em humanos, incluindo infecções cutâneas, septicemia e gastroenterite. As diferentes espécies encontradas dentro do gênero *Vibrio* podem ter diferentes nichos ecológicos, mas, em geral, são tipicamente de ambientes estuarinos ou/e marinhos, sendo necessária a compreensão profunda desses sistemas ecológicos para se entender sua ecologia global (THOMPSON *et al.*, 2007). A maioria das espécies necessita de NaCl (2-3%) para

crescer. Devido ao fato do ambiente aquático marinho ser seu nicho natural, esses microrganismos são comumente isolados de peixes e crustáceos. A maioria das espécies é mesófila e seus números aumentam durante o verão (COLWELL, 2006). Atualmente esse gênero compreende 91 espécies (DSMZ, 2010).

Membros do gênero *Vibrio* são capazes de proliferar com sucesso em áreas com grande disponibilidade de substrato e densidade celular (por exemplo, biofilmes), assim como persistir na forma de células pelágicas de vida livre. Os víbrios têm sido encontrados associados com organismos superiores e com superfícies inanimadas (MCDOUGALD; KJELLEBERG, 2006).

Segundo Diggles *et al.* (2000), as bactérias do gênero *Vibrio* são encontradas em ambientes marinhos estuarinos e algumas espécies podem causar doenças em peixes marinhos. De acordo com algumas pesquisas já foram identificados mais de 129 casos de doenças em espécies de peixes marinhos tropicais, quase 50% destas foram causadas pelos gêneros *Aeromonas* ou *Vibrio*. Espécies de *Vibrio* que tem sido correlacionadas com doenças de peixes incluem: o *Vibrio anguillarum*, *V. salmonicida*, *V. ordalii*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *Photobacterium damsela*.

A maioria dos peixes infectados pelas espécies de *Vibrio* tende a ter um escurecimento do corpo, diminuição do apetite, natação letárgica e procura a superfície da água devido à dificuldade respiratória. Os peixes gravemente infectados apresentam sérios sintomas de vibrioses como ulceração na pele, hemorragia na base da barbatana e na superfície do corpo necrosando aos poucos a barbatana e a cauda, com conseqüente distensão abdominal. Os rins e o fígado ficam claros e começam a deixar de funcionar (DIGGLES *et al.*, 2000).

Essas bactérias desempenham papéis importantes nas águas de superfície e habitam diversos nichos ecológicos, incluindo o trato intestinal dos peixes e lulas, sendo encontradas também como ectosimbiontes de crustáceos (SIMIDU; KANEKO; TAGA, 1977). Devido a sua ampla distribuição ecológica e importância na estrutura da comunidade marinha, sua identificação taxonômica tem sido extensivamente estudada. No ambiente marinho, as espécies podem ser encontradas em fontes hidrotermais, mar profundo, mar aberto, estuários e sedimentos marinhos (NISHIGUCHI; JONES, 2004).

A composição da biota bacteriana no trato digestivo de animais marinhos claramente difere da água do mar circundante, pois a disponibilidade de matéria orgânica para os víbrios no intestino desses animais é maior do que na água. Entretanto, este ambiente é representado por baixo pH, secreção de ácidos biliares e condições microaeróbias ou anaeróbias, restritivas aos componentes da microbiota (URAKAWA; RIVERA, 2006).

Espécies de *Vibrio* mostram uma forte correlação com plâncton marinho, principalmente o zooplâncton. Em geral, o zooplâncton abriga mais víbrios que o fitoplâncton. Interações mutualísticas com víbrios também têm sido amplamente estudadas. Um dos habitats mais comuns dos víbrios é o intestino de animais marinhos. Como muitas espécies de *Vibrio* produzem quitinase (RAMAIAH *et al.*, 2000), a maioria desses animais precisa dessa relação mutualística no seu processo de digestão (NISHIGUCHI; JONES, 2004).

2.5.3 – Coliformes

As bactérias do grupo coliformes são consideradas indicadores de poluição fecal nos corpos d'água de acordo com a Resolução 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (BRASIL, 2005). Segundo Silva, Junqueira e Silveira (1997), esse grupo divide-se em coliformes totais e termotolerante. Os coliformes totais incluem as bactérias na forma de bastonetes Gram-negativos, não esporogênicos, aeróbios ou aeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 48 horas a 35°C. Apresentam mais de 20 espécies, dentre as quais se encontram tanto bactérias originárias do trato intestinal de humanos quanto de outros animais homeotérmicos.

Quanto aos coliformes totais, a legislação não indica limites em pescado, mas é importante analisar a presença desse grupo em alimentos, por estarem relacionados à sua qualidade higiênica. Segundo Agnese *et al.* (2001), valores de coliformes totais acima de 50 Número Mais Provável (NMP) por grama de carne de pescado é motivo suficiente para um controle mais rígido relacionado à higiene de elaboração e comercialização do produto nos estabelecimentos comerciais.

Os coliformes termotolerantes são capazes de fermentar a lactose com produção de gás e aldeídos ácidos, em 24h a $44,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Esse grupo atua como indicador de poluição fecal, devido à sua ocorrência restrita às fezes do ser humano e dos animais homeotérmicos. Sua presença evidencia o risco da presença de organismos patogênicos de origem fecal. Fazem parte do grupo três gêneros: *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella* (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997).

A incidência de infecções por esse grupo é mais frequente nas regiões tropicais, onde predominam aglomerações populacionais, condições sanitárias precárias e a contaminação dos suprimentos aquíferos por material de origem fecal (KONEMAN *et al.*, 2001).

Por não fazer parte da microbiota do pescado, a presença dos coliformes está sempre associada à contaminação fecal da água do local de captura ou manuseio inadequado do pescado fresco pelo manipulador (FRAZIER; WESTHOFF, 1988).

2.6 – Uso de antimicrobianos na aquicultura

A utilização de antimicrobianos gerou grande otimismo em relação à prevenção e ao tratamento dos processos infecciosos. Entretanto, o uso exagerado e nem sempre criterioso ou racional dos antimicrobianos e quimioterápicos trouxe dificuldades, sendo a maior delas representada pela progressiva resistência bacteriana aos fármacos. As bactérias podem ser classificadas em sensíveis e resistentes aos antimicrobianos. Em geral, classificam-se como resistentes, as bactérias que crescem *in vitro*, nas concentrações médias que os antimicrobianos atingem no sangue, quando administrados por via oral. São sensíveis as que não crescem nessas concentrações. A resistência bacteriana pode ser natural ou adquirida. A natural corresponde a uma característica da espécie bacteriana, e a adquirida, à característica de uma ou mais amostras da espécie. A aquisição de resistência por uma célula bacteriana sensível é sempre decorrente de uma alteração genética (MANTILLA *et al.*, 2008).

O aumento da ocorrência de resistência antimicrobiana em bactérias provenientes de ambientes de produção animal e as possíveis implicações para saúde pública têm levado a uma intensiva fiscalização do uso de antimicrobianos. O ambiente aquícola é um importante meio para a seleção de espécies bacterianas resistentes a vários antimicrobianos, em virtude da utilização de tais substâncias no tratamento e profilaxia de doenças bacterianas em organismos aquáticos, muitas vezes de forma indiscriminada (SCHMIDT; MORTEN; DALSGAARD, 2000). Ainda, o contato físico entre as bactérias no meio aquático possibilita uma alta frequência de troca de elementos genéticos móveis, como plasmídios e *transposons*, codificadores de resistência aos antibióticos. Eventos como esses são particularmente importantes para difusão de resistência a drogas como a tetraciclina (RHODES *et al.*, 2000).

É considerado também emergente o problema da resistência a múltiplas drogas por um mesmo microrganismo, o que leva à dificuldade de tratamento de doenças bacterianas, tanto em animais quanto em seres humanos (ALDERMAN; HASTINGS, 1998). Considera-se que a seleção de clones bacterianos multi-resistentes ocorra principalmente em ambientes hospitalares e de produção animal (TEUBER, 2001). Os alimentos de origem animal contaminados durante o abate e processamento são considerados a principal via para o carregamento de bactérias resistentes aos antibióticos para os seres humanos. Poucos estudos

têm caracterizado a ocorrência de resistência a bactérias em ambientes aquícolas, particularmente em climas tropicais (HOWGATE, 1998).

O aparecimento de bactérias patogênicas resistentes a antimicrobianos em organismos aquáticos cultivados está relacionado ao uso contínuo dessas drogas na aquicultura. Em cultivos tratados com esses fármacos é possível encontrar resíduos das substâncias no sedimento, no músculo do pescado e nas fezes (SØRUM, 2006).

Segundo a Comissão da Comunidade Européia (2002), o uso dos antimicrobianos na aquicultura européia sofreu uma nítida redução nas últimas décadas, principalmente devido ao desenvolvimento de vacinas. A elaboração de novas vacinas é um dos objetivos primordiais desta comissão no intuito de minimizar a utilização dessas drogas como medidas profiláticas. Nos alimentos, os resíduos de antibióticos são controlados de acordo com a legislação vigente. Os países que exportam produtos alimentares para a União Européia devem também aplicar planos de controle dos resíduos, para cumprir os requisitos exigidos pelos países europeus.

No ano de 2008 foi publicada a primeira edição especial sobre Produção de Alimentos de Origem Animal lançada pelo *Codex Alimentarius*. É uma coleção com códigos e diretrizes de práticas publicadas numa forma resumida, no intuito de ser melhor visualizado pelos governos, autoridades regulatórias, indústrias de alimentos, comerciantes e consumidores. O Código de Práticas para Minimizar e Conter a Resistência aos Antimicrobianos (CAC RCP 61-2005) foi escrito nessa edição. Este documento possui informações relevantes sobre o uso consciente dos antimicrobianos nos cultivos de animais para a produção, tendo como objetivo diminuir os impactos provenientes dessas drogas e evitando assim, a resistência das bactérias aos antimicrobianos. No documento são citadas as responsabilidades dos órgãos envolvidos na fabricação e disseminação dessas substâncias. Por fim, este documento descreve a importância mundial dessas drogas no controle de enfermidades, mas ressalta que sejam usadas de maneira responsável e sejam fiscalizadas eficientemente (ANVISA, 2009).

2.7 - Microrganismos com potencial para uso na melhoria das condições ambientais da água de cultivo

A aquicultura gera uma considerável quantidade de resíduos, consistindo de subprodutos metabólicos como resíduos de ração, de fezes, de insumos terapêuticos e profiláticos, levando à deterioração da qualidade da água e focos de doença. A biorremediação é a aplicação de microrganismos nos sistemas de cultivo e, é o método

atualmente em uso para melhorar a qualidade da água, a manutenção da saúde e estabilidade dos sistemas de aquicultura. A biorremediação envolve a mineralização da matéria orgânica, do dióxido de carbono, maximizando a produtividade primária que estimula a produção dos organismos aquáticos, a nitrificação e desnitrificação que eliminam o excesso de nitrogênio nesses cultivos. São geralmente empregados na biorremediação para a degradação da matéria orgânica (decompositores) bactérias heterotróficas, nitrificantes e bactérias desnitrificantes (RAVICHANDRAN; SHAICK; JALALUDDIN, 2001).

2.7.1 - Bactérias nitrificantes

Segundo Sedlak (1991), Rusten, Lars e Odegaard (1995), a remoção biológica do nitrogênio da água envolve três processos básicos: assimilação, nitrificação e desnitrificação. Nitrificação é a conversão da amônia a nitrato por meio de ação bacteriana, na presença de oxigênio dissolvido, sendo realizada em duas etapas: nitritação (oxidação da amônia a nitrito) seguido pela nitratação (oxidação do nitrito a nitrato). As bactérias nitrificantes são, na maioria, autotróficas utilizando CO₂ como fonte de carbono e a oxidação de compostos nitrogenados como fonte de energia.

Os processos biológicos de transformação de amônia em nitrato melhor estudados são os realizados pelas bactérias autotróficas. A nitrificação autotrófica é efetuada por dois grupos de bactérias: o primeiro responsável pela oxidação a nitrito e o segundo pela oxidação do nitrito a nitrato. Não há descrição na literatura de uma bactéria capaz de oxidar completamente a amônia a nitrato (ABREU, 1994).

As subclasses β , e γ da classe *Proteobacteria*, contém a maior parte das espécies de bactérias nitrificantes, isto é, aquelas responsáveis pela oxidação da amônia. Entre estas se destacam os gêneros *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* e *Nitrospira* (BOTHE; JOST; SCHLOTTER, 2000).

As bactérias do gênero *Nitrosomonas* são as mais conhecidas no processo de nitrificação, porém Abreu (1994) apresenta outros gêneros como as *Nitrosocystis*, *Nitrosospira*, *Nitrosogloea*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosococcus* e *Nitrosolobus*. As bactérias mais conhecidas envolvidas na nitratação pertencem ao gênero *Nitrobacter*.

Surmacz-Górska, Cichon e Miksch (1997) comentam que a baixa taxa de nitrificação ocorre pela inibição da atividade e crescimento da bactéria *Nitrobacter*. Por isso alguns pesquisadores têm eliminado a segunda etapa da nitrificação (oxidação do nitrito a nitrato), proporcionando desnitrificação diretamente a partir do nitrito.

Em sua maioria, as bactérias nitrificantes autotróficas apresentam baixa velocidade de crescimento e baixo rendimento celular. Existe ainda diferença no tempo de crescimento entre os gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*, por exemplo. As *Nitrobacter* têm crescimento mais lento que a outra. Sob condições ideais, o tempo de geração das bactérias do gênero *Nitrosomonas* são oito horas enquanto que o das bactérias do gênero *Nitrobacter* são dez horas (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2000).

Jetten (1997) comenta que, embora as bactérias nitrificantes autotróficas sejam predominantes na natureza, a nitrificação pode também ocorrer pela ação de bactérias nitrificantes heterotróficas, como, por exemplo, *Arthrobacter* e *Thiosphaera pantotropha*. Estes microrganismos utilizam o carbono orgânico e oxidam a amônia a nitrato.

Bitton (1994) cita que a nitrificação heterotrófica é muito menor que a autotrófica e que provavelmente não possui contribuição significativa. Entretanto, Jetten (1997) comenta que isto pode ser porque a nitrificação é medida por meio da determinação dos produtos da oxidação (nitrito e nitrato) e as bactérias nitrificantes heterotróficas não acumulam grande quantidade desses produtos. Os autores observaram que a *Thiosphaera pantotropha* não era apenas uma bactéria nitrificante heterotrófica, mas também uma desnitrificante aeróbia, ou seja, o organismo convertia a maior parte do nitrito diretamente em nitrogênio gasoso.

A desnitrificação é o processo de remoção de nitrogênio por meio da redução do nitrato a nitrogênio gasoso realizada biologicamente sob condições anóxicas. Este ambiente é caracterizado tradicionalmente pela ausência de oxigênio dissolvido na forma molecular, associada com a presença de nitratos. Como é realizado por organismos heterotróficos, o processo da desnitrificação necessita de matéria orgânica, como fonte de carbono, para a sua síntese celular (METCALF; EDDY, 1991).

Ocorre a desnitrificação a partir do nitrato ou nitrito, e não da amônia, por isso este processo deve ser precedido da nitrificação. Os microrganismos envolvidos na desnitrificação são heterotróficos do tipo facultativo (ARCEIVALA, 1981).

Tiedje (1984) comenta que os microrganismos desnitrificantes mais frequentemente encontrados na natureza são dos gêneros *Pseudomonas* e *Alcaligenes*. Entretanto Metcalf e Eddy (1991) citam ainda *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Mirococcus*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Proteus* e *Spirillum*, entre outros gêneros dessas bactérias. A nitrificação e a desnitrificação são processos fundamentais, pois diminuem a quantidade de amônia e nitrito que são tóxicos aos organismos aquáticos e diminuem também a quantidade de nitrato, evitando assim a eutrofização.

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral

Quantificar e identificar grupos bacterianos presentes na água de recirculação usada para cultivo, em uma estação de piscicultura marinha experimental.

3.2 - Objetivos específicos

Para gerar dados que ajudassem a alcançar o objetivo principal foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- Analisar os parâmetros físico-químicos da água: salinidade, temperatura, pH, oxigênio dissolvido e amônia;
- Monitorar a presença de coliformes termotolerantes dentro do sistema de cultivo;
- Acompanhar a carga bacteriana da água de cultivo através da quantificação de bactérias heterotróficas totais, grupos de bactérias nitrificantes e do gênero *Vibrio*;
- Isolar e identificar fenotipicamente as bactérias a partir das amostras de água;
- Testar a sensibilidade dos isolados de *Vibrio* frente a antimicrobianos frequentemente usados na terapêutica humana e de organismos aquáticos cultivados;
- Identificar perfis de multi-resistência entre os isolados de *Vibrio*;
- Detectar a possível origem genômica das resistências a antimicrobianos entre os isolados de *Vibrio* através da técnica de “cura” plasmidial.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Descrição dos pontos de coleta

As coletas foram realizadas no Centro de Estudos Ambientais Costeiros – CEAC, do Instituto de Ciências do Mar/LABOMAR da Universidade Federal do Ceará – UFC, localizado no Estuário do Rio Pacoti (Eusébio, Ceará; 3°53'15" S; 38°22'30" O).

A água utilizada no cultivo de peixes é proveniente do Rio Pacoti, em ponto distante cerca de 1,5 Km do afluente. Após a captação (Ponto 1), a água passa pelo sistema de tratamento obedecendo às seguintes etapas: tanque de desinfecção (Ponto 2), filtro de areia, filtro mecânico, tanque de decomposição aeróbia (Ponto 3), filtro biológico (Ponto 4), tanque de recirculação (Ponto 5), *skimmer* onde são retirados os compostos químicos indesejáveis e o sistema ultravioleta até chegar ao tanque de cultivo (Ponto 6) onde são cultivados peixes da espécie *Lutjanus analis*, a Cioba (Figura 2).

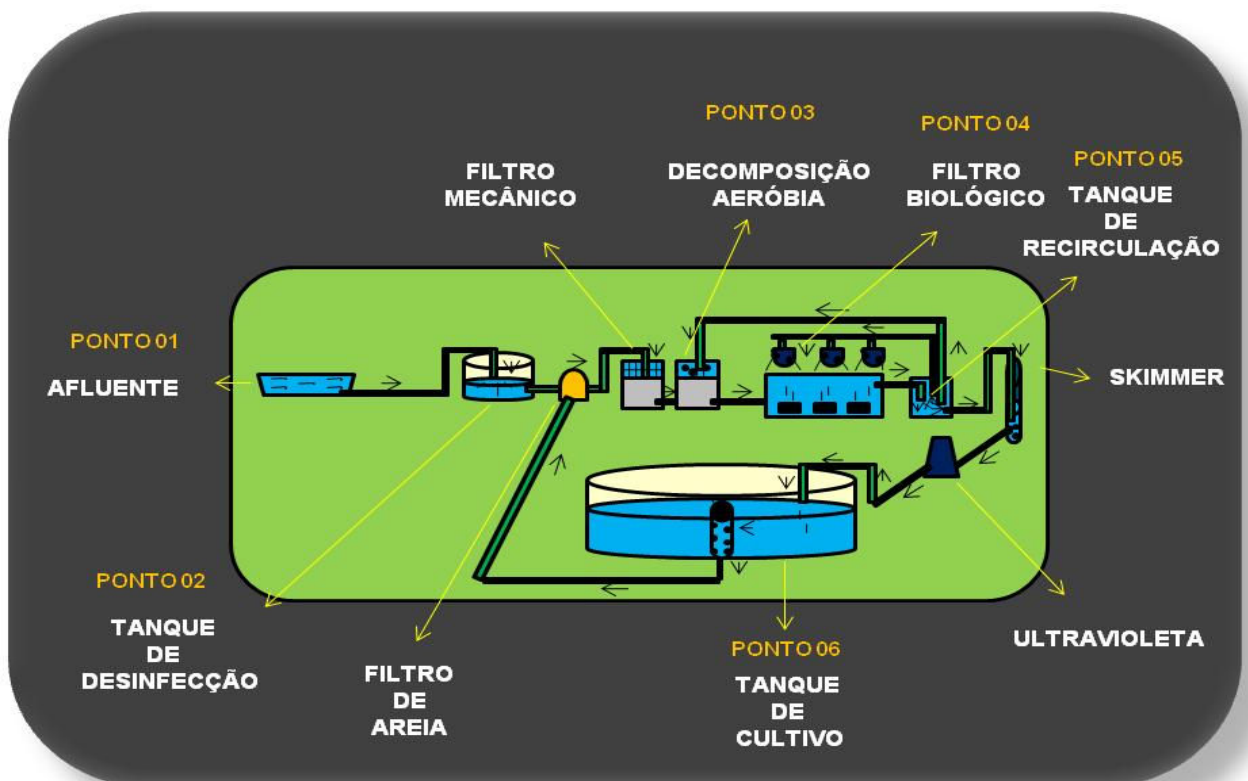


Figura 2 – Sistema Fechado de Tratamento de Água da Estação de Piscicultura Marinha do CEAC-LABOMAR.

4.1.1 – Descrição do Sistema

Etapas do sistema fechado de tratamento de água da Estação de Piscicultura Marinha do CEAC/LABOMAR e seu funcionamento (Figura 2):

1 - Tanque de desinfecção: contém cloro numa concentração de 10 ppm, a água proveniente do Rio Pacoti é desinfetada no intuito de eliminar parasitas, bactérias patogênicas e outros organismos que possam transmitir doenças para os peixes do cultivo;

2 - Filtro de areia: usado para retirar sólidos em suspensão e impurezas mais grosseiras, como: barro, ração, dejetos, etc;

3 – Filtro mecânico: remove os resíduos sólidos da água, impedindo a obstrução do biofiltro;

4 – Decomposição aeróbia: deterioração da matéria orgânica por bactérias aeróbias;

5 – Filtro biológico: conversão da amônia em nitrato por bactérias nitrificantes;

6 – Tanque de recirculação: a água nesse tanque é proveniente do tratamento biológico, uma parte fica circulando pelo sistema e a outra parte continua a ser tratada até chegar aos tanques de cultivo;

7 – *Skimmer*: reduz a quantidade de compostos químicos indesejáveis na água do cultivo, através da fragmentação de bolhas;

8 – Radiação ultravioleta (U.V.): utilizada para eliminar bactérias patogênicas, parasitas e outros organismos que possam colocar em risco a continuidade do cultivo.

4.1.2 – Coleta das amostras

Foram coletadas amostras de água nos seguintes pontos da estação de piscicultura: no afluente (Rio Pacoti) (Ponto 01), no tanque de desinfecção (Ponto 02), no tanque de decomposição aeróbia (Ponto 03), no filtro biológico (Ponto 04), no tanque de recirculação (Ponto 05) e no tanque de cultivo (Ponto 06); perfazendo um total de seis pontos (Figura 3). As coletas foram realizadas no período compreendido entre setembro de 2007 e maio de 2008, perfazendo um total de 8 coletas envolvendo o período de chuva e estiagem.

As amostras de água foram coletadas em recipientes de vidro âmbar com capacidade para 1 litro, previamente esterilizados e transportadas, sob refrigeração, até o Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado – LMAP/LABOMAR onde foram realizadas as análises microbiológicas.



Figura 3 – 1. Afluente (Rio Pacoti), 2. Tanque de desinfecção, 3. Tanque de decomposição aeróbia, 4. Filtro biológico, 5. Tanque de recirculação, 6. Tanque de cultivo.

4.1.3 – Análises físico-químicas

No momento das coletas foram verificadas as variáveis ambientais: salinidade (refratômetro: Bernauer Aquacultura modelo: F-300), pH (pHmetro: Bernauer Aquacultura modelo: F-1002), temperatura e oxigênio dissolvido da água (Termômetro e oxímetro: Bernauer Aquacultura modelo: F-1055). O teor de amônia foi verificado com o uso de teste comercial (Tetratest). No Ponto 2, apenas o teor de amônia foi monitorado por causa da elevada concentração de cloro que poderia danificar os equipamentos.

4.2 - Análises Microbiológicas

4.2.1 – Processamento das amostras de água

Em laboratório foram feitas diluições seriadas das amostras de água em solução salina com 0,85 e 1% de NaCl (10^1 a 10^{-4}).

4.2.2 – Avaliação da qualidade bacteriológica das águas da estação de cultivo

A colimetria das amostras de água seguiu a técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos (FTM) em séries de cinco tubos (APHA, 2000). Foi realizada a prova presuntiva para a determinação do Número Mais Provável (NMP), semeando 1mL das amostras em diluições seriadas (10^1 a 10^{-3}) de tubos contendo caldo lauril-sulfato-triptose (LST) e incubadas a 35°C durante 48 horas. A partir dos tubos positivos na prova presuntiva, foram inoculadas alçadas em tubos com caldo Bile Verde Brillante (BVB) e caldo EC, que foram incubados a 35°C por 48 horas e a 44,5°C por 24 horas, respectivamente (Figura 4).

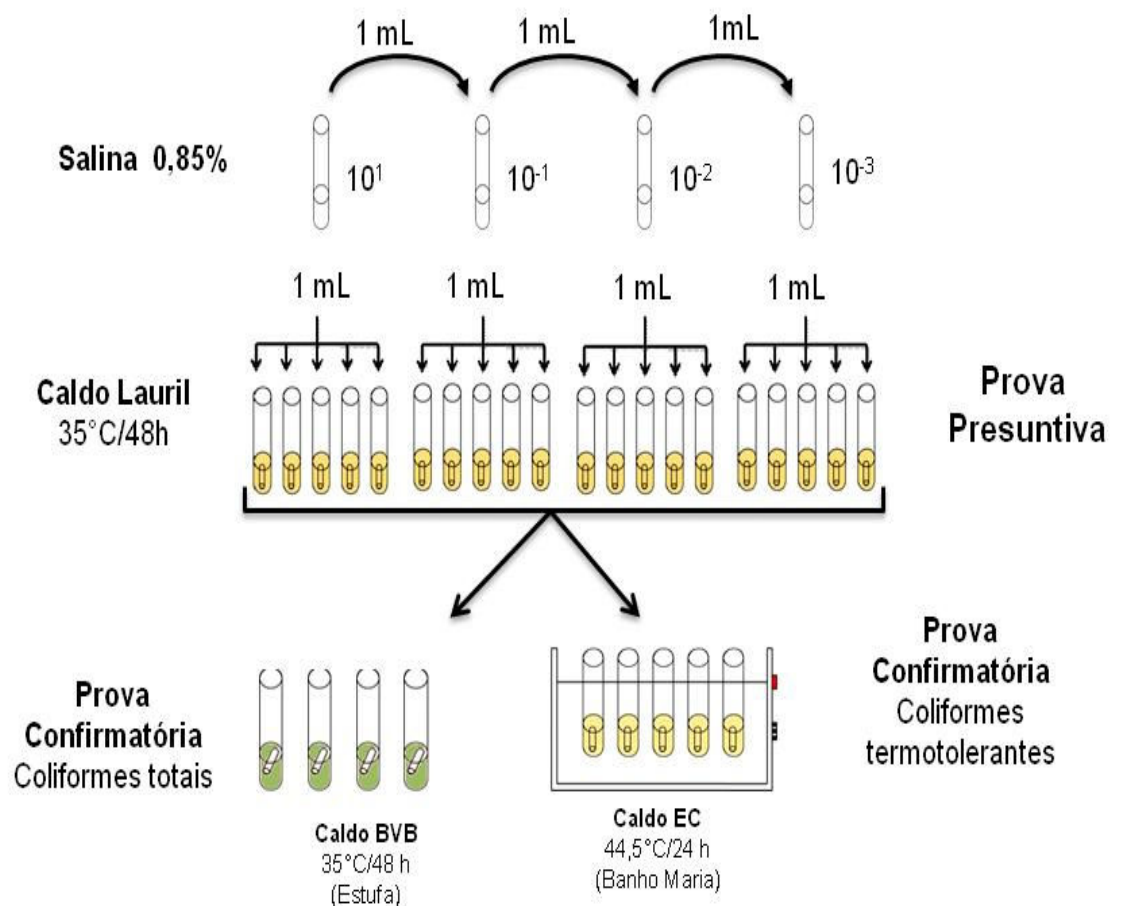


Figura 4 - Esquema de análise para contagem de coliformes totais/termotolerantes das amostras de água de um sistema fechado de cultivo de peixes marinhos.

4.2.3 – Quantificação de grupos bacterianos

O número das bactérias heterotróficas totais foi determinado seguindo a metodologia descrita por Silva, Junqueira e Silveira (1997). O método utilizado foi à Contagem Padrão em Placas usando *Plate Count Agar* com 1% NaCl, em placas contendo o meio de cultura. Aliquotas de 1mL das diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-3}) foram inoculados em duplicata sobre a superfície das placas de Petri, onde em seguida foi vertido o meio de cultura (técnica de *Pour Plate*) sendo estas imediatamente homogeneizadas com movimentos circulares. Após este procedimento as placas foram incubadas por 48 horas a uma temperatura de 35°C. Posteriormente as placas contendo entre 25 a 250 colônias crescidas sobre o meio foram contadas usando um contador da marca Phoenix (modelo: EC 550 A) (Figura 5).

Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias por mililitro de amostra (UFC/mL) (DOWNES; ITO, 2001).

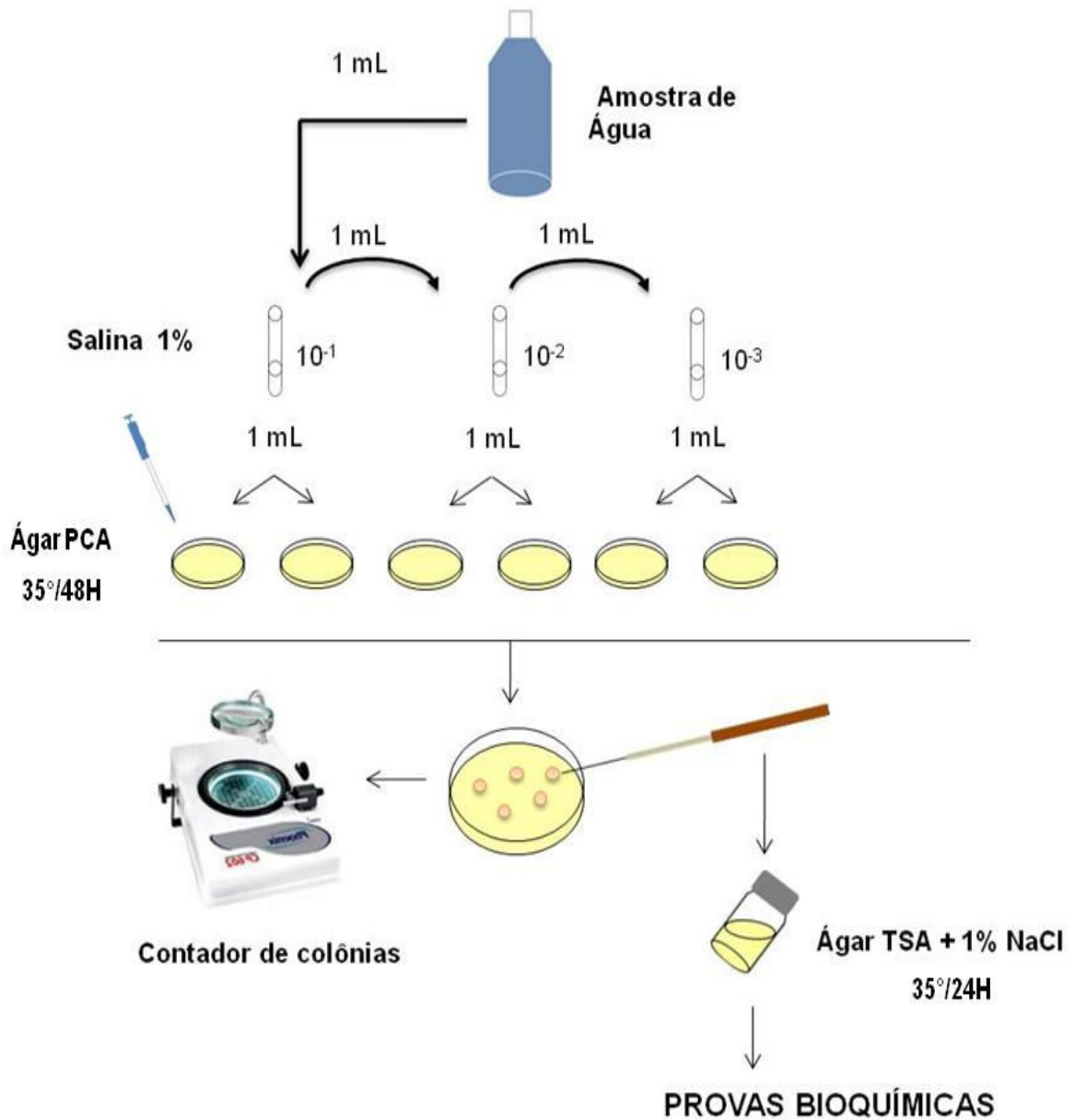


Figura 5 - Esquema de análise para contagem das bactérias do grupo das heterotróficas totais das amostras de água de um sistema fechado de cultivo de peixes marinhos.

4.2.4 – Contagem de Bactérias Nitrificantes Totais

A estimativa dessas bactérias foi realizada seguindo a metodologia descrita por Schmidt e Belser (1984), através de Contagem Padrão em Placas (CPP). Foi utilizado o meio de cultura seletivo, com a seguinte composição: cloreto de sódio (NaCl), extrato de carne, peptona, nitrato de potássio (KNO₃) e ágar-ágar. Este meio de cultura foi esterilizado em autoclave por 15 minutos a uma temperatura de 121°C. Foram feitas diluições seriadas das amostras em salina a 1% de NaCl. Alíquotas de 0,1mL das diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-4}),

com auxílio de uma pipeta, foram inoculadas sobre a superfície do meio já solidificado. O inóculo foi feito em duplicata e espalhado com o auxílio de uma alça de Drigalski (técnica *Spread Plate*).

Após este procedimento as placas foram incubadas por 24 horas a uma temperatura de 35°C. Posteriormente as placas contendo entre 25 a 250 colônias crescidas sobre o meio, foram quantificadas usando um contador de colônias da marca Phoenix (modelo: EC 550 A) (Figura 6). Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias por mililitro de amostra (UFC/mL) (DOWNES; ITO, 2001).

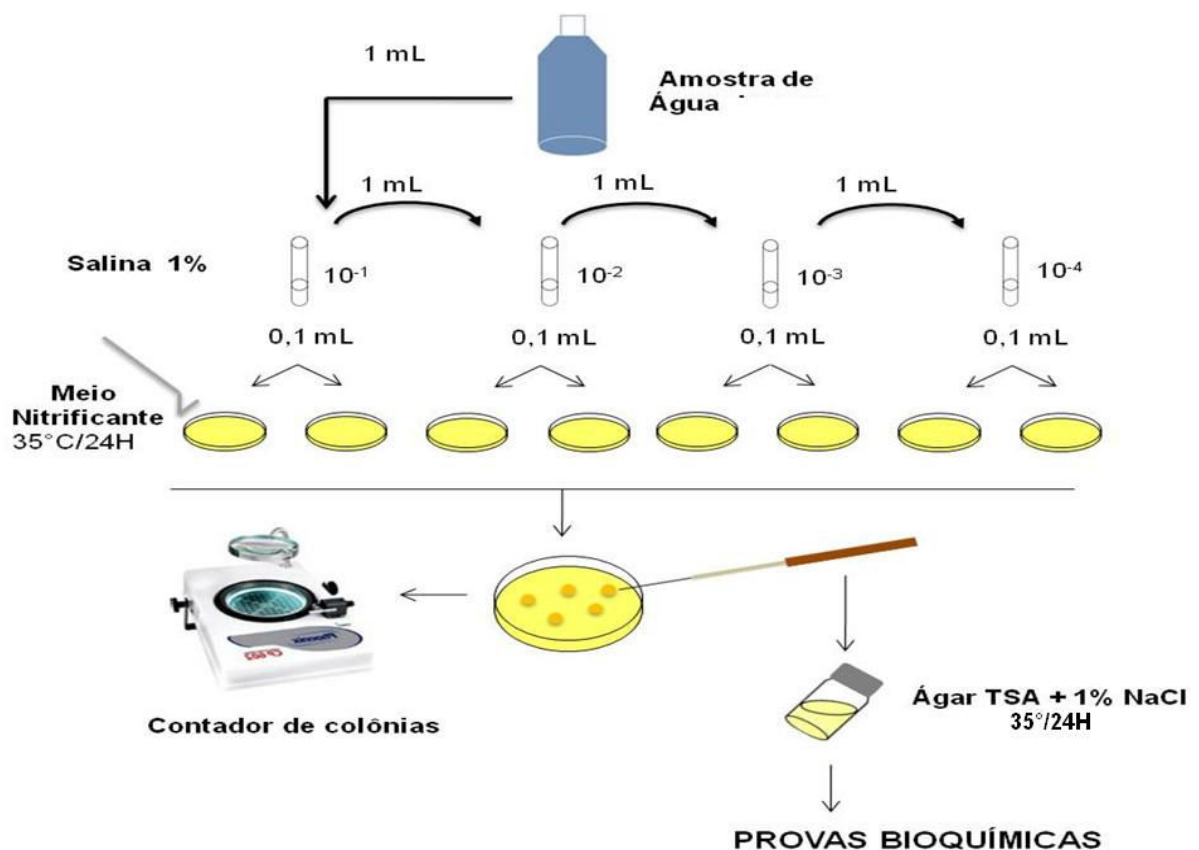


Figura 6 - Esquema de análise para contagem das bactérias do grupo das nitrificantes das amostras de água de um sistema fechado de cultivo de peixes marinhos.

4.2.5 – Contagem de *Vibrio spp*

Para a quantificação de bactérias do gênero *Vibrio* foi utilizada a técnica de Contagem Padrão em Placas (CPP). Aliquotas de 0,1mL das diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-3}) foram inoculadas sobre a superfície do meio seletivo Ágar Tiosulfato Citrato Bile-Sacarose (TCBS) (Técnica *Spread Plate*). Os inóculos foram feitos em duplicata e as placas incubadas a 30°C

por 24h, seguindo metodologia descrita por Elliot *et al.* (2001). Após o período de incubação, as placas contendo entre 25 a 250 colônias foram contadas usando um contador da marca Phoenix (modelo: EC550A) (Figura 7).

Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias por mililitro de amostra (UFC/mL) (DOWNES; ITO, 2001).

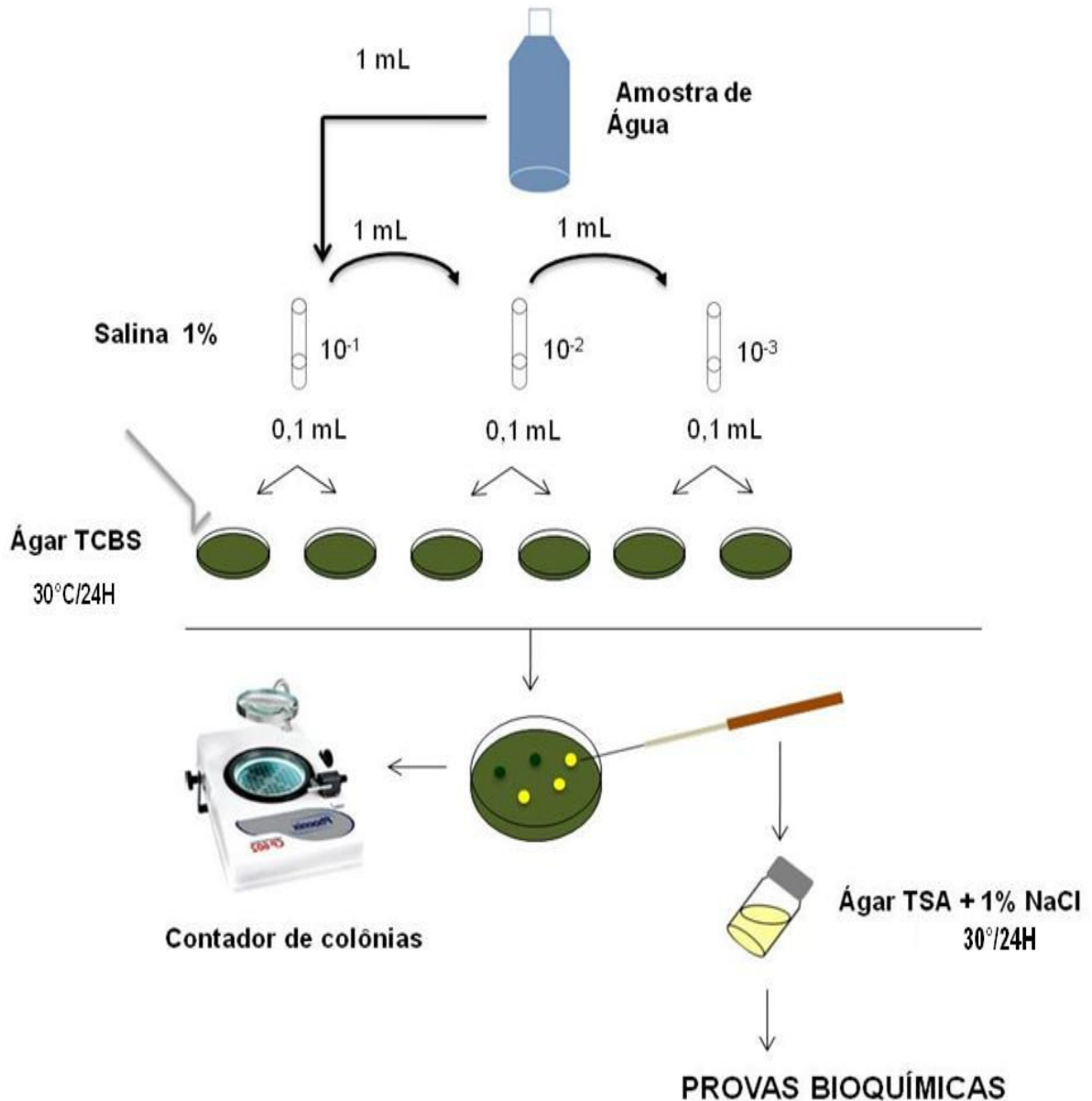


Figura 7 - Esquema de análise para contagem dos vibrios das amostras de água de um sistema fechado de cultivo de peixes marinhos.

4.2.6 – Isolamento e Identificação das estirpes bacterianas

A partir do crescimento sobre a superfície dos meios (TCBS, PCA e o meio para nitrificantes) foram realizados isolamentos de colônias para posterior purificação e identificação fenotípica através de testes morfológicos e bioquímicos.

4.2.6.1 – Bactérias Heterotróficas Totais

Colônias crescidas sobre o meio Ágar PCA foram isoladas em Ágar triptona soja (TSA) contendo 1% de NaCl, com incubação em estufa a 35°C por 24 horas. As culturas foram submetidas à coloração de Gram.

Na identificação das culturas puras foram realizadas as seguintes provas bioquímicas propostas por Koneman *et al.*(2006), Murray *et al.*(2005), Mahon e Manuselis (1995), Menezes e Neufeld (2006), Oplustil *et al.*(2004), Lelliott e Stead (1987), Shivagi *et al.*(1988), Bernardes *et al.* (2003) e pelo manual de Bergey's (STALEY *et al.*, 2005): descarboxilação dos aminoácidos (lisina, ornitina e arginina), redução de nitrato, crescimento em 0% de NaCl a 35°C, crescimento em meio Mac Conkey, em meio TCBS, oxidação da glicose, fermentação da glicose, oxidase, motilidade, gelatinase, novobiocina, pigmento violeta e amarelo, gás em glicose, fermentação de carboidratos (manitol, xilose, inositol, sorbitol e arabinose), catalase, urease, tolerância ao NaCl 0%, 3%, 5%, 6% e 6,5%, crescimento a 40°C, hemólise, citrato, coagulase, indol, vermelho de metila (VM), Voges-Proskauer (VP), DNase, sulfeto de hidrogênio (H₂S) e hidrólise da esculina.

4.2.6.2 – Bactérias Nitrificantes Totais

Colônias crescidas sobre o meio Ágar seletivo para bactérias nitrificantes foram isoladas em Ágar triptona soja (TSA) contendo 1% de NaCl, com incubação em estufa a 35°C por 24 horas. As colônias puras foram submetidas à coloração de Gram.

Na identificação das culturas puras foram seguidas as recomendações de Koneman *et al.*(2006), Murray *et al.*(2005), Menezes e Neufeld (2006), Dworkin *et al.*(2006), Ludwig, Mittenhuber e Friedrich (1993), Rasoamananjara, Korosec e Monteil (1987), Funkel e Carlitol (1994) e do manual de Bergey's (STALEY *et al.*, 2005). Foram realizados os seguintes testes e provas bioquímicas: descarboxilação dos aminoácidos (lisina, ornitina e arginina), redução de nitrato, crescimento em meio Mac Conkey, em meio TCBS, oxidação da glicose,

fermentação da glicose, oxidase, motilidade, gelatinase, pigmento amarelo, gás em glicose, fermentação de carboidratos (manitol, xilose, inositol, sorbitol, arabinose, sacarose, maltose e lactose), catalase, uréase, tolerância ao NaCl 0%, 3%, 4%, 5% e 6%, crescimento a 40°C, citrato, indol, vermelho de metila (VM), Voges-Proskauer (VP), DNase, sulfeto de hidrogênio (H₂S) e hidrólise da esculina.

4.2.6.3 - *Vibrio spp*

Colônias crescidas sobre o meio Ágar TCBS foram isoladas em Ágar triptona soja (TSA) contendo 1% de NaCl, com incubação em estufa a 35°C por 24 horas. As colônias puras foram submetidas à coloração de Gram. Foram realizados os testes de motilidade, e as provas bioquímicas de descarboxilação dos aminoácidos (lisina, ornitina e arginina), fermentação de carboidratos (sacarose e manitol), produção de indol, oxidase, gelatinase, crescimento em 0% de NaCl a 35°C, crescimento a 40°C, citrato, ONPG e redução de nitrato, conforme as chaves de identificação de Alsina e Blanch (1993) e Nogueroles e Blanch (2008).

4.2.7 – Teste de Antibiograma das estirpes isoladas da família Vibrionaceae

As estirpes identificadas foram submetidas a testes para se estabelecer o perfil de resistência frente a 13 antimicrobianos das seguintes famílias: Aminopenicilina: ampicilina (AMP) (10µg); Nitrofurano: nitrofurantoina (NIT) (300µg); Aminoglicosídeo: estreptomicina (EST) (10µg) e gentamicina (GEN) (10µg); Cefalosporina: cefalotina (CFL) (30µg), cefotaxima (CTX) (30µg); Tetraciclina: tetraciclina (TET) (30µg) e oxitetraciclina (OXI) (30µg); Clorofenicol: cloranfenicol (CLO) (30µg) e florfenicol (FLF) (30mg); Quilonona: ácido nalidíxico (NAL) (30µg); Fluorquinolona: ciprofloxacino (CIP) (5µg) e a Sulfonamida: sulfazotrim (SUT) (25mg). O teste de antibiograma seguiu protocolos estabelecidos por CLSI (2009).

Foi preparado um inóculo a partir do crescimento bacteriano em meio ágar TSA 1% e transferido com o auxílio de uma alça de níquel-cromo para salina a 1% até que se conseguisse uma suspensão comparável à turbidez padrão correspondente a 0,5 da escala de McFarland (1,5 x 10⁸ UFC/mL). Para essa comparação foi utilizado um aparelho fotométrico (Micronal B542), em absorvância de 625 nm. O limite de leitura aceitável variou entre 0,08 e 0,10. Em placa de Petri contendo Ágar Mueller-Hinton numa espessura de 4 mm, o inóculo

foi espalhado uniformemente com o auxílio de um *swab* estéril, de modo a cobrir homogeneamente toda a superfície da placa.

Foram utilizados discos de antimicrobianos comerciais da marca Laborclin. Os discos foram aplicados no meio, inoculado com o auxílio de uma pinça estéril, e pressionados, levemente, sobre a superfície do meio. Após a secagem, por um período máximo de 15 minutos, as placas foram incubadas invertidas, em estufa a 35°C por 24h. A leitura do antibiograma foi realizada com auxílio de um paquímetro digital (Digit), a partir da medição em milímetros, do diâmetro dos halos de inibição do crescimento das colônias, frente ao antimicrobiano testado. Os resultados obtidos foram comparados com os protocolos estabelecidos por CLSI (2009). As cepas foram classificadas em sensíveis, intermediárias ou resistentes para cada antimicrobiano testado (Figura 8).

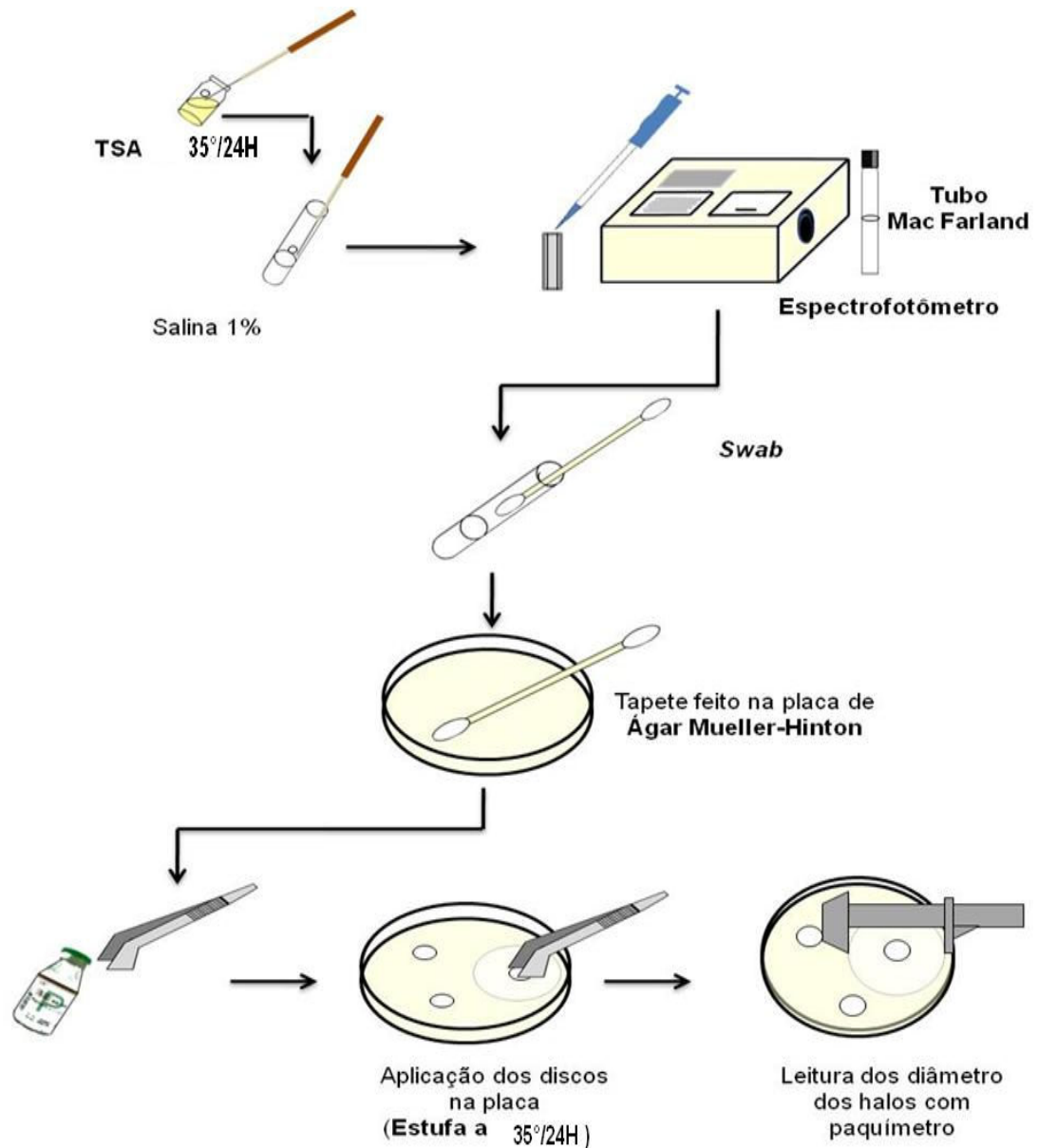


Figura 8 - Esquema de antibiograma das espécies bacterianas isoladas da família Vibrionaceae das amostras de água de um sistema fechado de cultivo de peixes marinhos.

4.2.7.1 – Cura Plasmidial

As cepas submetidas ao teste de antibiograma que apresentaram perfil de resistência a determinados antimicrobianos foram submetidas à cura plasmidial, realizada de acordo com Molina-Aja *et al.* (2002).

O procedimento da cura plasmidial seguiu as seguintes etapas: após o crescimento bacteriano em meio ágar TSA, uma alíquota foi inoculada com o auxílio de uma alça de níquel-cromo em meio TSB (Caldo Triptona de Soja) a 1% de NaCl e incubados a 35°C por 24 horas. Aliquotas das culturas renovadas foram adicionadas a tubos com o meio caldo Luria

Bertani (LB) a 1% de NaCl e suplementado com 100 µg/mL de acridine-orange. O controle foi feito com inóculo das culturas em caldo LB com 1% de NaCl sem adição de acridine-orange. Os tubos foram incubados em estufa a 35°C por 24h, após esse período as cepas foram inoculadas em TSA a 1% de NaCl e depois foram incubadas novamente a 35°C por 24h. Posteriormente estas culturas foram novamente expostas aos mesmos antimicrobianos aos quais apresentaram resistência (Figura 9).

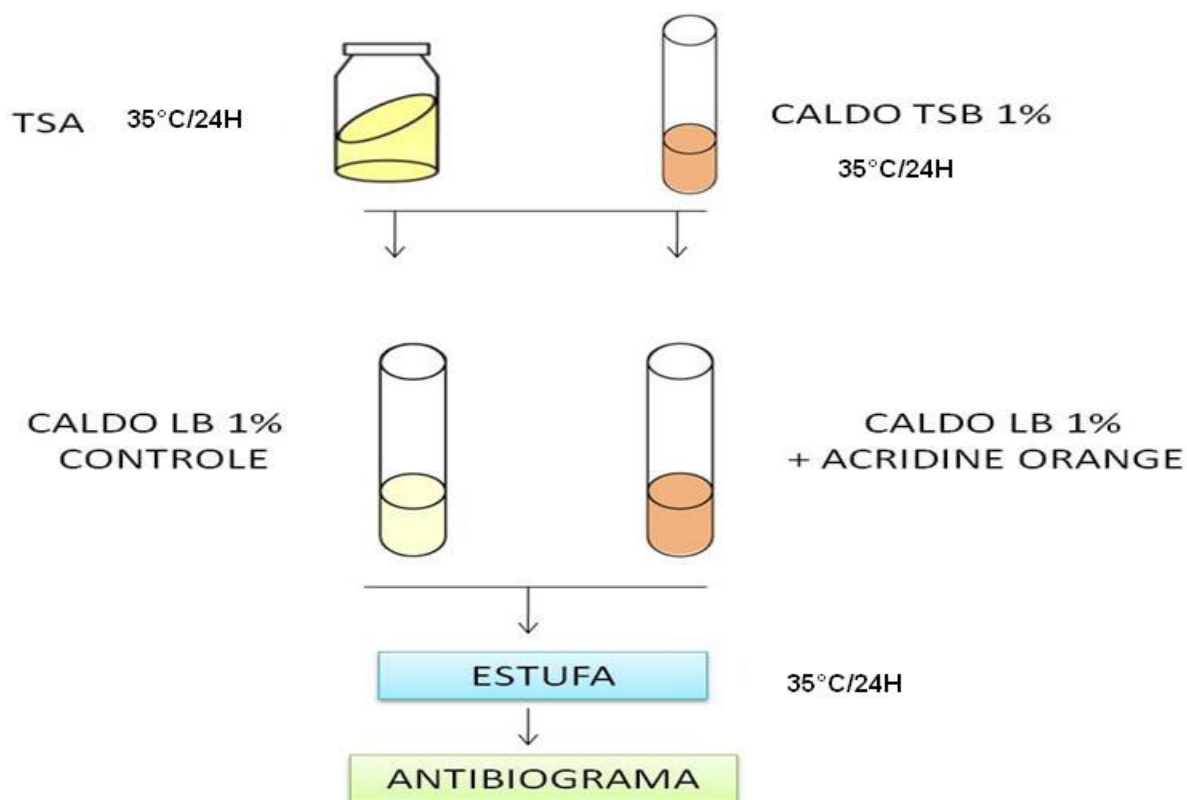


Figura 9 - Esquema do procedimento de cura plasmidial, ao qual foram submetidas as estirpes bacterianas com perfil de resistência aos antimicrobianos testados.

4.3– Análise dos Resultados

Os resultados dos parâmetros físico-químicos das amostras foram agrupados através do cálculo das médias aritméticas e o desvio padrão. Os dados da estatística descritiva e confecção das tabelas e gráficos foram processados no programa MS-Excel, versão 2007.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios dos parâmetros físico-químicos analisados da água dentro do sistema estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores médios e desvio padrão dos parâmetros físico-químicos da água dentro do sistema fechado de cultivo de peixes marinhos registrados no momento das coletas.

Pontos	Temperatura (°C)	Salinidade (‰)	pH	O.D. (mg/L O ₂)	Amônia (mg/L N)
1	27,96 (±1,09)	30 (±13,52)	8,05 (±0,24)	5,43 (±0,65)	0,22 (±0,23)
2	SA*	SA*	SA*	SA*	0,06 (±0,18)
3	27,78 (±0,81)	35,25 (±1,03)	7,52 (±0,22)	5,94 (±0,17)	0,31 (±0,37)
4	27,73 (±0,86)	35,25 (±1,03)	7,51 (±0,24)	6,00 (±0,19)	0,25 (±0,27)
5	27,37 (±1,75)	35,25 (±1,03)	7,51 (±0,24)	6,37 (±0,16)	0,25 (±0,27)
6	27,56 (±0,87)	35,25 (±1,03)	7,40 (±0,21)	5,40 (±0,25)	0,75 (±0,53)

Legenda: Pontos: 1 Afluente (Rio Pacoti), 2 Tanque de desinfecção, 3 Tanque de decomposição aeróbia, 4 Filtro biológico, 5 Tanque de recirculação, 6 Tanque de cultivo. SA* - Sem análise

A temperatura variou muito pouco entre os pontos mantendo-se em torno de 27°C, tendo uma maior variação evidenciada pelo desvio padrão no ponto 5 que corresponde ao tanque de recirculação. O valor médio verificado e a pouca variação da temperatura é a situação normal em ambientes tropicais.

Variações de temperatura são parte do regime climático normal e, corpos de água naturais apresentam variações sazonais e diurnas, bem como estratificação vertical. A temperatura superficial é influenciada por fatores tais como latitude, altitude, estação do ano, período do dia, taxa de fluxo e profundidade. A temperatura desempenha um papel principal de controle no meio aquático, condicionando as influências de uma série de variáveis físico-químicas (BOYD, 1999).

A faixa de temperatura encontrada nas águas desse cultivo, de acordo com Madigan, Martinko e Parker (2004) favorece o crescimento das bactérias mesófilas.

Segundo Melo, Saker-Sampaio e Vieira (1990), a temperatura é um fator de fundamental importância, uma vez que sua elevação provoca um aumento considerável no número de microrganismos, quando a água contém pequena quantidade de elementos nutritivos. As variações na temperatura podem exercer diferentes efeitos sobre a autodepuração da água, inicialmente acelerando o metabolismo dos microrganismos aquáticos e, posteriormente aumentando o consumo de oxigênio necessário à respiração aeróbica.

As bactérias têm uma ampla variedade de faixas de temperatura. Assim, elas podem ser classificadas em três grupos, de acordo com as temperaturas para o seu crescimento:

psicrófilos (abaixo de 20°C), mesófilos (20 a 45°C) e termófilos (acima de 45°C) (SILVA, 1999).

A salinidade foi o parâmetro que apresentou maior variação ao longo das coletas. No ponto de captação da água, no estuário do Rio Pacoti, esta média ficou em torno de 30‰, mas apresentou oscilação que variou de 6‰ a 40‰. Esse ponto é influenciado pelas variações das marés.

A salinidade é a medida do conteúdo em sal da água, sendo a concentração expressa em g de sal por Kg de água do mar (‰). Os principais íons na água do mar são os de cloro e de sódio, suplementados por potássio, cálcio, magnésio, sulfatos e, em menor escala, por muitos outros. A salinidade da água do mar é aproximadamente de 35‰, tendendo a ser mais baixa em mares costeiros (33‰) e mais elevada em águas tropicais (37‰). Em água doce é sempre inferior a 0,5‰. Na água dos estuários varia de 0,5 a 35‰ (DAY *et al.*, 2000).

Quanto à oscilação nos valores da salinidade encontrada em P1, isso ocorreu por se tratar de um ponto que tem influência das marés, chuvas e contato com desembocadura de rios, pois os estuários são corpos de água costeiros semi-fechados que têm uma ligação livre com o mar e nos quais a água deste se dilui, de forma mensurável com água doce proveniente da drenagem terrestre (SCHETTINI, 2002).

O potencial de hidrogênio iônico (pH) encontrado no decorrer das coletas se mostrou pouco variável nos pontos dentro do sistema de cultivo analisados (P3 a P6). No P1, o valor deste parâmetro foi um pouco mais elevado (8,05), mas está dentro da faixa de pH para água marinha (6,5 a 8,5) especificada na Resolução 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (BRASIL, 2005).

O pH não variou muito nesses pontos (P3 a P5), por pertencerem ao sistema fechado de tratamento de água e nem em P6, ponto de cultivo com recirculação de água tratada. Segundo Lesordo, Masser e Rakocy (1998) nesse tipo de sistema os parâmetros físico-químicos se mantêm estáveis. No caso do pH, as moléculas de dióxido de carbono são controladas na água constantemente pelo sistema, garantindo assim que o pH fique dentro da faixa ideal de crescimento dos organismos aquáticos que é de 6,0 a 9,0 (BOYD, 1999).

Em pesquisa realizada por Fonseca, Marins e Lacerda (2008), foi observado o valor do pH 7,99 no estuário do Rio Pacoti, próximo da média encontrada nesta pesquisa.

Os teores médios de oxigênio dissolvido (O.D.) oscilaram entre 5,40 a 6,37 mg/L O₂, ficando dentro dos padrões da legislação vigente para corpos de água destinados a pesca ou cultivo de organismos para fins de consumo intensivo (BRASIL, 2005), sendo o mínimo

aceitável de 5mg/L O₂. Os valores médios mais elevados foram registrados nos pontos P4 e P5, locais providos de maior oxigenação no sistema.

Os menores valores foram registrados nos pontos de captação (P1) e dentro do tanque de cultivo (P6). Nestes pontos existem um maior aporte de matéria orgânica e uma maior quantidade de organismos consumidores de oxigênio. A abundância de fitoplâncton é controlada pela oferta de nutrientes, e as concentrações de oxigênio dissolvido são reguladas pela presença de fitoplâncton. O uso de rações nos cultivos contribui para a poluição da água ao gerar resíduos metabólicos orgânicos e inorgânicos. Consequentemente, a abundância de fitoplâncton e outros microrganismos diminuem a taxa de oxigênio dissolvido em função do incremento da alimentação (HENRY-SILVA, 2001). O descarte de esgoto doméstico nos rios contribui para a diminuição de oxigênio nestes (PIMENTA *et al.*, 2002).

Os valores médios de amônia no sistema variaram de 0,06 a 0,75mg/L N, sendo os pontos extremos observados dentro dos tanques de desinfecção (P2) e de cultivo (P6), respectivamente. Nos pontos P4 e P5 os teores se mostraram estáveis em 0,25mg/L N. O nível de amônia dentro do tanque de cultivo (P6) apresentou 0,75mg/L N. Segundo Boyd (1999), a tolerância dos organismos aquáticos a amônia é de 2mg/L N. Nos padrões estabelecidos para corpos de água destinados a pesca ou cultivo de organismos para fins de consumo intensivo da Resolução 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente não estão inseridos níveis para a amônia (BRASIL, 2005).

Os peixes confinados, normalmente, recebem alimento com altos níveis de proteínas. Parte dessas proteínas é assimilada pelo animal e convertida. O restante é eliminado, e o nitrogênio contido nesses resíduos pode ser excretado como nitrogênio orgânico na forma de fezes ou como amônia, principal forma de excreção de nitrogênio dos peixes. O nitrogênio também pode aumentar nos tanques de cultivo dos peixes em virtude da adição de fertilizantes, como o sulfato de amônio, e adubos orgânicos, como também em razão da decomposição da ração não consumida (BALDISSEROTO, 2002).

A qualidade de água é vital para a piscicultura, portanto é imprescindível a manutenção destes parâmetros, evitando assim o estresse dos peixes, pois segundo Ono (1998), em sistemas de confinamento, os peixes não têm condições de buscar, no ambiente, locais com melhor qualidade de água, agravada pelo adensamento da população.

Segundo Boyd (1999), com parâmetros ideais e estáveis os peixes crescem mais rápido, pois ficam menos estressados e estão menos propensos a doenças, tendo assim um cultivo mais saudável.

Parâmetros microbiológicos também são importantes na manutenção da qualidade da água do cultivo de organismos aquáticos. O monitoramento da presença de bactérias do grupo coliforme foi feito no decorrer das coletas nos pontos P1, P2 e P6.

Em P2, ao longo de todas as coletas, os valores estimados foram menores que 1,8 NMP/100mL. Os números mais prováveis de coliformes totais (CT) variaram em P1 de $<1,8$ a $3,4 \times 10^2$ e em P6 de $<1,8$ a $2,2 \times 10^2$ e os termotolerantes (CTt) oscilaram no Ponto 1 de $<1,8$ a $6,8 \times 10$ e em P6 de $<1,8$ a $2,2 \times 10^2$ (Tabela 2).

Carvalho (2006) analisando a qualidade bacteriológica da água, do solo e do camarão, em quatro fazendas de camarões do Estado do Ceará encontrou valores para o NMP de CT e CTt/100mL variando de $<1,8$ a $5,4 \times 10^3$.

O maior NMP observado para CT foi em P1, no estuário do Rio Pacoti que recebe descargas de matéria orgânica, provindas de esgotos domésticos. Esse fato também pode ser evidenciado pela média de pH (8,05).

Tabela 2 – Resultados do monitoramento de coliformes totais e termotolerantes na água em um sistema fechado de cultivo de peixes marinhos.

PONTOS	Parâmetros (NMP/100mL)	Meses							
		1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°
P1	CT	$<1,8$	$3,4 \times 10^2$	$2,0 \times 10$	$<1,8$	$<1,8$	$1,1 \times 10^2$	$4,5 \times 10$	$1,3 \times 10^2$
	CTt	$<1,8$	$6,8 \times 10$	$<1,8$	$<1,8$	$<1,8$	$6,8 \times 10$	$4,5 \times 10$	$6,8 \times 10$
P2	CT	$<1,8$	$<1,8$	$<1,8$	$<1,8$	$<1,8$	$<1,8$	$<1,8$	$<1,8$
	CTt	$<1,8$	$<1,8$	$<1,8$	$<1,8$	$<1,8$	$<1,8$	$<1,8$	$<1,8$
P6	CT	$2,0 \times 10$	$2,0 \times 10^2$	$<1,8$	$6,8 \times 10$	$2,2 \times 10^2$	$2,0 \times 10$	$4,5 \times 10$	$1,7 \times 10^2$
	CTt	$<1,8$	$<1,8$	$<1,8$	$<1,8$	$2,2 \times 10^2$	$<1,8$	$4,5 \times 10$	$2,0 \times 10$

CT – Coliformes totais; CTt – Coliformes termotolerantes.

Queiroz (2005), em estudo realizado no Rio Pacoti, afirmou que este rio não se enquadrava nos padrões estabelecidos pela legislação. Esse autor encontrou em seu trabalho valores de NMP para CTt elevados variando de 5×10^3 a 15×10^3 , ficando estes valores acima dos padrões permitidos para águas salinas da Classe 1 destinadas a aquicultura pela Resolução 357 do CONAMA (BRASIL, 2005) como também estavam fora dos parâmetros estabelecidos pela Resolução 274 do CONAMA (BRASIL, 2000) para águas destinadas a recreação de contato primário.

Na presente pesquisa em quatro das oito coletas as bactérias coliformes termotolerantes estiveram presentes no Ponto 1, mas em níveis abaixo do permitido para o cultivo de organismos marinhos.

Em P2, os valores de coliformes totais e termotolerantes foram menores que 1,8, limite mínimo de detecção para a técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos. Este ponto corresponde ao tanque de desinfecção mostrando que a etapa de cloração é eficiente na remoção das bactérias da água captadas no ambiente e que alimentam o cultivo.

Números mais elevados de coliformes voltaram a aparecer nas amostras do ponto P6 a partir da quinta a oitava coleta com exceção da sexta, isso pode está relacionado a uma falha na higienização pessoal do colaborador ou na cloração do tanque de desinfecção.

Em todas as coletas foi observada a presença das bactérias coliformes totais, com exceção da terceira coleta porque neste mês foi realizada uma limpeza total do tanque de cultivo. As bactérias coliformes termotolerantes estiveram presentes em 37,5% das amostras (3/8).

May (2009) pesquisando o tratamento de águas cinzentas utilizando o cloro para a desinfecção obteve um percentual de 99,8% na eliminação dos coliformes termotolerantes, o que demonstra a efetividade da substância frente aos microrganismos.

Segundo Vieira e Tôrres (2004), o grupo coliforme é originário tanto do trato gastrointestinal do homem e de animais de sangue quente, como também de outros ambientes. Os coliformes termotolerantes são compostos por 90% da bactéria *Escherichia coli*, sendo esta a única espécie cujo habitat primário é o trato gastrointestinal do homem e o de animais com sangue quente.

A contaminação da água é a modificação de sua qualidade de tal forma a torná-la inapta aos mais diversos usos como: indústria, agricultura, pesca, atividades recreativas e/ou danosa ao contato do próprio homem, de outros animais domésticos ou selvagens (DERISIO, 1992).

Todos os resultados observados na Tabela 2 ficaram dentro dos valores permitidos pela Resolução 357 do CONAMA de 2005, que estabelece um limite máximo de coliformes termotolerantes para águas de cultivo, de 1000/100mL, baseado em pelo menos seis amostras bimestrais do mesmo ponto por um período de doze meses (BRASIL, 2005).

Segundo Shafai *et al.* (2004), o monitoramento do nível de coliformes termotolerantes é usado como um indicador da presença de bactérias patogênicas na água. Por isso, a presença dessas bactérias em um ambiente de cultivo de pescado destinado a alimentação humana é preocupante.

Os resultados das Contagens Padrão em Placas (CPP) das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) das bactérias heterotróficas (BHT), nitrificantes (NIT) e de *Vibrio* (VIB) nas

amostras de água em um sistema fechado de cultivo de peixes marinhos encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Quantificação de bactérias heterotróficas totais, bactérias nitrificantes e vibrios em um sistema fechado de cultivo de peixes marinhos, expressas em Unidades Formadoras de Colônias por mililitro de amostra (UFC/mL).

PONTOS	Parâmetros (UFC/mL)	Meses							
		1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º
1	BHT	4,0x10 ² est.	5,0 x10est.	1,0 x10 ³ est.	4,5 x10 ² est.	1,0 x10 ³ est.	1,25 x10 ³ est.	4,65 x10 ³	3,5 x10 ² est.
	NIT	2,47 x10 ⁵	1,0x 10 ⁵ est.	7,1x10 ⁶	1,32 x10 ⁶	3,35 x10 ⁴	4,0 x10 ³ est.	5,2x x10 ⁶	3,5 x10 ³
	VIB	<10	1,5 x10 ² est.	<10	<10	<10	<10	<10	<10
2	BHT	<10	<10	<10	<10	2,10 x10 ³ est.	1,0 x10 ² est.	3,4 x10 ³	1,0 x10 ² est.
	NIT	<10	2,5 x10 ⁴	1,5 x10 ³ est.	5,0 x10 ² est.	4,7 x10 ⁵	1,0 x10 ³ est.	5,0 x10 ⁴	<10
	VIB	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
3	BHT	<10	2,5 x10 ² est.	2,5 x10 ³ est.	2,85 x10 ⁴	2,2 x10 ⁴	6,35x10 ³	1,02 x10 ⁴	8,0 x10 ² est.
	NIT	1,5 x10 ⁴ est.	1,29 x10 ⁶	2,5 x10 ⁷ est.	1,75 x10 ⁴ est.	7,95 x10 ⁴	5,05 x10 ⁴	5,95x10 ⁴	1,58 x10 ⁶
4	BHT	9,85 x10 ³	1,0 x10 ² est.	4,25 x10 ³	3,05 x10 ³	9,15 x10 ³	3,45 x10 ³	5,4 x10 ³	4,5 x10 ² est.
	NIT	1,25x10 ⁴ est	1,6 x10 ⁴ est.	2,5 x10 ⁷ est.	1,75 x10 ⁴ est.	5,0x10 ⁵	4,0 x10 ⁴	5,35 x10 ⁴	2,5 x10 ⁵ est.
5	BHT	1,25x10 ⁴ est	5,0 x10est.	7,0 x10 ³ est.	1,55 x10 ³ est.	6,95 x10 ³	1,44 x10 ⁴	2,35 x10 ³	6,5 x10 ³ est.
	NIT	1,9 x10 ⁵	1,6 x10 ⁴ est.	2,37 x10 ⁷ est.	7,0 x10 ³ est.	5,1 x10 ⁴	2,46 x10 ⁵	3,65 x10 ⁴	1,09x10 ⁷
6	BHT	9,5 x10 ²	5,0x10 ² est.	4,85 x10 ⁴	1,31x10 ⁵	1,95 x10 ³ est.	5,3 x10 ³	2,02 x10 ⁴	2,4 x10 ³
	NIT	2,5 x10 ⁵ est.	7,8 x10 ⁴	1,44 x10 ⁶	1,68 x10 ⁵	9,4 x10 ⁴	7,95 x10 ⁴	1,79 x10 ⁵	1,85 x10 ⁴
	VIB	2,37 x10 ⁴	3,0 x10 ² est.	<10	2,25 x10 ³ est.	5,0 x10 ³ est.	1,75x10 ³ est.	6,3 x10 ³	1,05 x10 ³ est.

BHT – Bactérias heterotróficas totais; NIT – Bactérias nitrificantes; VIB – Vibrios; est- valores estimados.

Foi observada uma variação na contagem padrão entre as bactérias de <10 a $2,5 \times 10^7$ (est.) UFC/mL em todas as contagens. Os grupos bacterianos de BHT e NIT foram quantificados em todos os pontos, já a contagem de vibrios foi feita apenas em P1, P2 e P6. Os valores das Unidades Formadoras de Colônias de bactérias heterotróficas oscilaram ao longo dos meses e dos pontos, de <10 a $1,31 \times 10^5$ (Figura 10). Sousa (2006) avaliando o perfil da comunidade microbiana de ecossistemas manguezal, receptores de efluentes da atividade de cultivo de camarões no Estado do Ceará observou em amostras de água que a contagem das BHT ficou em torno de 10^4 UFC/mL.

A quantificação das bactérias heterotróficas totais fornece informações sobre a carga bacteriana das amostras. Em P2, as BHT apresentaram números dentro do limite de contagem a partir da quinta coleta. Antes disso, o surgimento de colônias ficou abaixo de 10 UFC/mL. Como este ponto é referente ao tanque de cloração, essa ausência já era esperada. A partir da quinta coleta, as contagens variaram de 10^2 (est.) a $3,4 \times 10^3$ UFC/mL o que pode ser indicativo de falhas nessa etapa de desinfecção.

Em P6, foram verificadas contagens na ordem de 10^5 UFC/mL. Nesse ponto a presença dessas bactérias é favorecida pela concentração de matéria orgânica disponível provinda da ração e das fezes dos peixes cultivados. Muitas bactérias heterotróficas que oxidam anaerobiamente a matéria orgânica, usando NO_3 como receptor terminal de elétrons, funcionam como facultativas desnitrificantes. As bactérias desnitrificantes utilizam preferencialmente o oxigênio molecular, que compete com o nitrato na função de receptor de elétrons. Desta forma, este processo ocorre na ausência de oxigênio e na presença de nitrato, ou seja, em ambiente anóxico (SOUSA; FORESTI, 1999).

Comparando as contagens de bactérias nitrificantes (NIT) na água desse sistema foi possível verificar que essas bactérias alcançaram valores maiores que aqueles registrados para as BHT ao longo do monitoramento. Este fato pode ser explicado pela especificidade do meio e a menor competição no cultivo *in vitro*.

O sistema propicia melhores condições para o crescimento das bactérias nitrificantes, visto que estas realizam seus processos de degradação dos compostos nitrogenados e crescem melhor na presença de oxigênio (MORIARTY *et al.*, 1983).

As contagens de NIT variaram de <10 a $2,5 \times 10^7$ UFC/mL. Os valores elevados das bactérias NIT ocorreram em quase todos os pontos com exceção de P2. Mesmo com os pontos P4 e P5 não estando em condições ótimas devido à falta de aeração, já era esperada uma

maior concentração de bactérias NIT em relação às BHT, por se tratarem de etapas de nitrificação do tratamento de água, que favorecem a multiplicação de bactérias com potencial de degradação da amônia, comprovado pelos níveis estáveis de oxigênio dissolvido.

No P6 existe uma grande quantidade de resíduos provenientes das rações e fezes dos peixes, favorecendo a presença de bactérias NIT, pois este é o ponto de cultivo. Em sistemas de criação, o alimento introduzido na água é o principal fator que contribui para o aumento da concentração de amônia, ocorrendo assim a sua degradação pelas bactérias nitrificantes em presença de oxigênio (KUBITZA, 1999).

Os resultados das CPP de *Vibrio* no P1, P2 e P6 variaram de <10 a $2,37 \times 10^4$ UFC/mL. Em P1, apenas na segunda coleta, foi possível detectar a presença de vírios sobre o meio de cultura seletivo. Este fato pode estar relacionado à alta variação de salinidade encontrada nas águas do rio Pacoti, que é desfavorável para essas bactérias. A maioria das espécies de *Vibrio* são halofílicas, precisando assim de NaCl para sobreviver e crescer (SAMUELSEN *et al.*, 2006).

No tanque de cultivo (P6) foram observados os maiores valores, que variaram de <10 a $2,37 \times 10^4$ UFC/mL. A estabilidade da salinidade dentro do sistema e a presença de vírios no trato intestinal dos peixes marinhos excretados através das fezes podem ser as determinantes da colonização do sistema. Segundo Verschuere *et al.* (2000), fatores físico-químicos influenciam no desenvolvimento microbiano, tais como: salinidade, temperatura e concentração de oxigênio. Esta combinação de fatores relaciona e define bem os microrganismos que vão proliferar num determinado ambiente.

Devido ao fato do ambiente aquático marinho ser o nicho natural das espécies de *Vibrio*, estes microrganismos são comumente isolados de peixes e crustáceos. A maioria das espécies é mesófila, crescendo o ano todo em ambientes tropicais (COLWELL, 2006).

Os vírios estão presentes naturalmente na microbiota intestinal dos peixes, mas eles são oportunistas e em eventos de estresse, se tornam uma grande ameaça para a saúde dos peixes (SAMUELSEN *et al.*, 2006).

O monitoramento da presença e quantificação da população de vírios em sistemas fechados é de extrema importância para o cultivo uma vez que os principais patógenos de organismos marinhos cultivados fazem parte desse gênero.

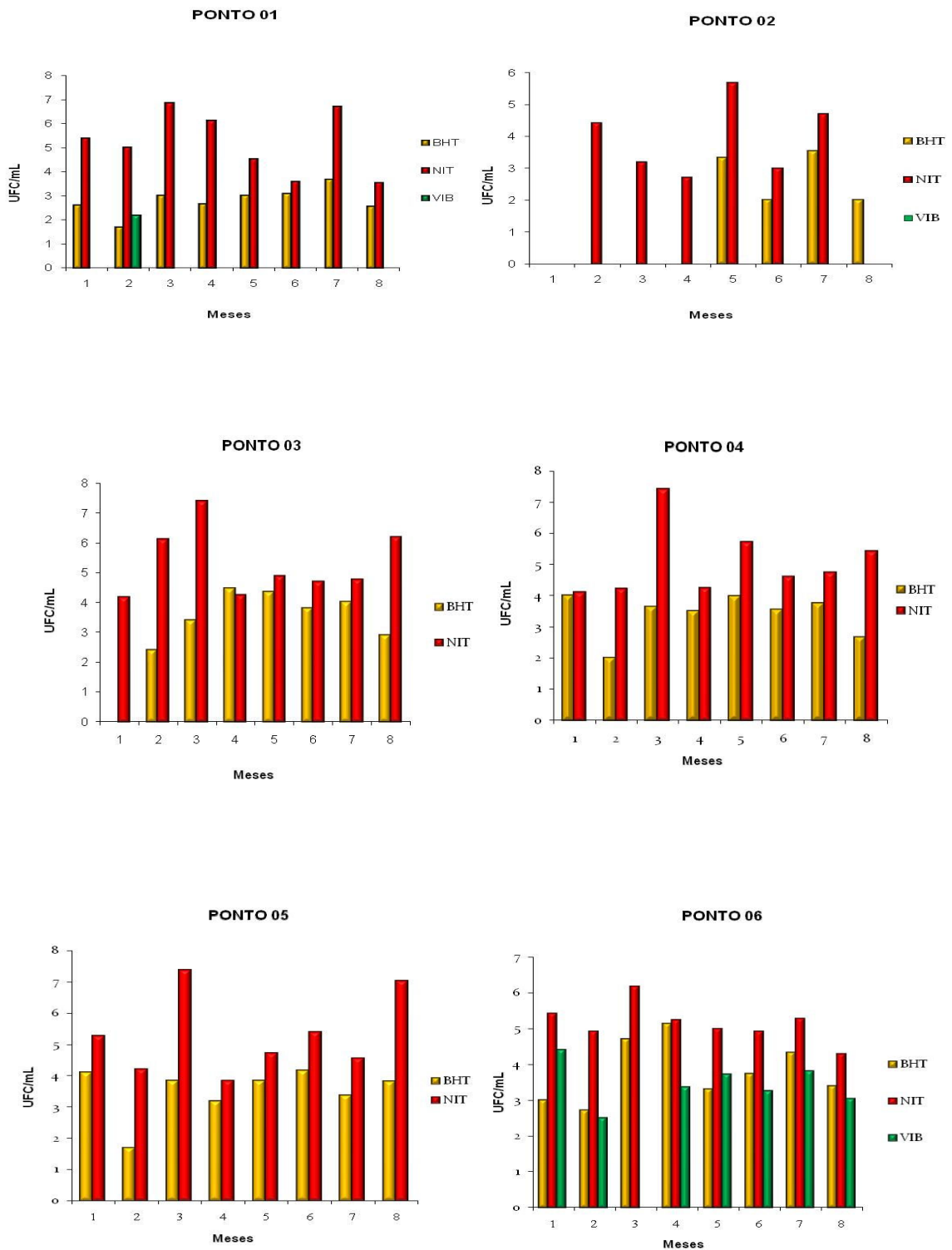


Figura 10 – Logaritmo dos valores de bactérias heterotróficas totais (BHT), bactérias nitrificantes (NIT) e vírios (VIB) da água do sistema fechado de cultivo de peixes marinhos, expressas em unidades formadoras de colônias por mililitro de amostra (UFC/mL).

Das 51 estirpes bacterianas pertencentes ao grupo das bactérias heterotróficas totais isoladas dos meios sólidos de cultivo foram identificadas 40 cepas distribuídas em 13 gêneros distintos: *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bordetella*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Moraxella*, *Photobacterium*, *Planococcus*, *Staphylococcus* e *Vibrio* (Tabela 4).

Tabela 4 - Identificação de estirpes bacterianas pertencentes ao grupo das heterotróficas totais isoladas sobre meio ágar PCA inoculado com amostras de água de um sistema fechado de cultivo de peixes marinhos.

Identificação	Número de isolados
<i>Aeromonas caviae</i>	7
<i>Aeromonas hydrophyla</i>	1
<i>Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida</i>	5
<i>Aeromonas sobria</i>	1
<i>Alcaligenes spp</i>	1
<i>Arthrobacter spp</i>	2
<i>Bordetella spp</i>	1
<i>Corynebacterium spp</i>	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	1
<i>Enterococcus spp</i>	1
<i>Leuconostoc spp</i>	3
<i>Listeria monocytogenes</i>	2
<i>Moraxella spp</i>	1
<i>Photobacterium augustum</i>	2
<i>Planococcus spp</i>	2
<i>Staphylococcus spp</i>	1
<i>Vibrio coralliilyticus</i>	3
<i>V. mediterranei</i>	2
<i>V. mimicus</i>	2
<i>V. nereis</i>	1
Total de isolados	51
Total de isolados identificados	40

Rittmann e Langeland (1986) apresentaram os seguintes gêneros de bactérias heterotróficas isoladas de águas residuárias: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Hiphomicrobium*, *Chromobacterium*, *Halobacterium*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Paracoccus*, *Azospirillum*, *Rhodopseudomonas*, *Thiobacillus*, *Vibrio*, *Xanthomonas* e *Klebsiella*.

Na presente pesquisa também foram isolados os gêneros: *Alcaligenes*, *Moraxella* e *Vibrio*. Michaud *et al.* (2006) em seu trabalho de caracterização filogenética das comunidades

de bactérias heterotróficas em um sistema aquícola marinho com recirculação de água, encontraram também os gêneros: *Vibrio* e *Enterococcus*.

As espécies *Aeromonas caviae* e *Aeromonas salmonicida subsp salmonicida* foram as que apresentaram maior percentual de isolamento nas amostras, 17,5% e 12,5%, respectivamente (Figura 11).

A espécie *A. caviae* é patogênica de peixes causando grande mortalidade em várias espécies. Esse patógeno emergente produz fatores de virulência tais como citotoxinas, enterotoxinas e hemólises sobre humanos e animais aquáticos (TROWER *et al.*, 2000).

A. salmonicida subsp. salmonicida causa furunculoses e severas septicemias resultando em morte, especialmente em peixes de águas frias. Causam também doenças caracterizadas por ulcerações na pele, onde esta patologia externa pode levar a uma subsequente septicemia, podendo ocasionar a morte (HUMPHREY; ASHBURNER, 1993).

Outras espécies isoladas foram: *Aeromonas hydrophyla* (2,5%), *Aeromonas sobria* (2,5%), *Alcaligenes spp* (2,5%), *Bordetella spp* (2,5%), *Corynebacterium spp* (2,5%), *Enterococcus faecalis* (2,5%), *Enterococcus spp* (2,5%), *Moraxella spp* (2,5%), *Staphylococcus spp* (2,5%), *Vibrio nereis* (2,5%), *V. mimicus* (5%), *V. mediterranei* (5%), *Planococcus spp* (5%), *Photobacterium augustum* (5%), *Listeria monocytogenes* (5%), *Arthrobacter spp* (5%), *V. coralliilyticus* (7,5%), *Leuconostoc spp* (7,5%) (Figura 11).

Destas, as espécies do gênero *Vibrio* foram as mais isoladas, somando 20% dos isolados identificados. Apesar do Ágar PCA não ser seletivo, a maioria das espécies de *Vibrio* é de bactérias heterotróficas dominantes no ambiente marinho, amplamente distribuídas em todo o mundo. Os víbrios colonizam a superfície e o trato intestinal dos organismos marinhos (COLWELL; GRIMES, 1984).

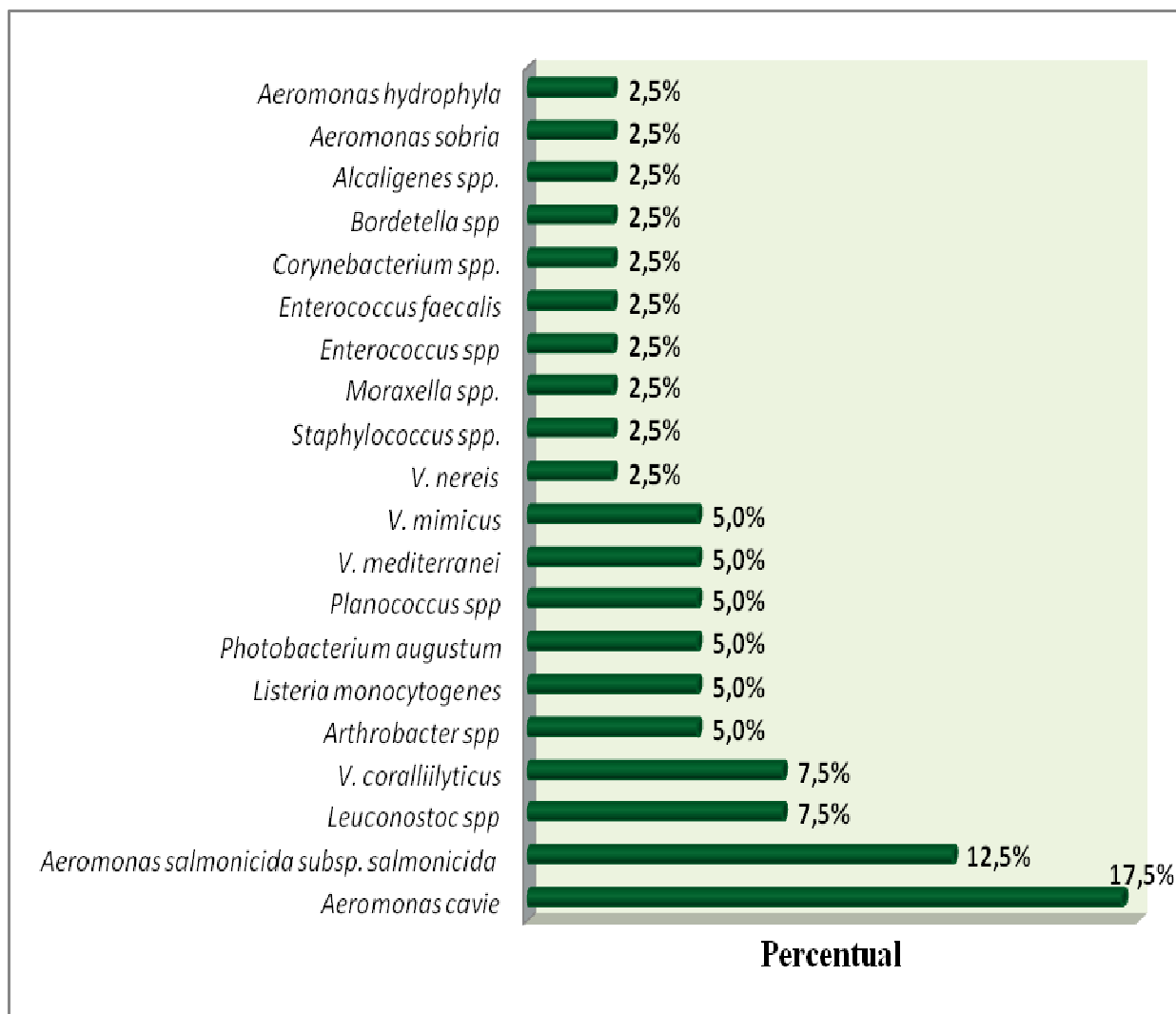


Figura 11 – Percentual de espécies de bactérias heterotróficas totais identificadas das amostras de água do sistema fechado de cultivo de peixes marinhos.

A partir do meio seletivo para bactérias com capacidade para a nitrificação, foram isoladas 53 estirpes sendo 41 delas identificadas. Os isolados se distribuíram em 8 gêneros distintos (Tabela 5) sendo eles: *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Flavobacterium*, *Paracoccus*, *Proteus* e *Vibrio*.

Tabela 5 – Identificação de estirpes bacterianas pertencentes ao grupo das nitrificantes isoladas de amostras de água de um sistema fechado de cultivo de peixes marinhos.

Identificação	Número de isolados
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	2
<i>Alcaligenes spp</i>	7
<i>Arthrobacter spp</i>	10
<i>Brevibacterium spp</i>	2
<i>Flavobacterium spp</i>	3
<i>Paracoccus spp</i>	8
<i>Proteus spp</i>	1
<i>Vibrio spp</i>	8
Total de isolados	53
Total de isolados identificados	41

O processo de nitrificação é realizado por várias espécies de bactérias. Este processo pode ser autotrófico ou heterotrófico. Sendo os dois gêneros mais importantes no autotrófico: *Nitrosomonas*, responsável pela redução da amônia a nitrito e *Nitrobacter*, que reduz o nitrito a nitrato, utilizam o gás carbônico como fonte de carbono (BROCK; MADIGAN, 1991).

A nitrificação heterotrófica é realizada por bactérias como, por exemplo: *Thiosphaera pantotropha*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes* e *Paracoccus* (BITTON, 1994; MATSUZAKA *et al.*, 2003). Os gêneros *Arthrobacter* (24,4%), *Paracoccus* (19,5%), *Vibrio* (19,5%) e *Alcaligenes* (17,1%), foram os que tiveram o maior destaque entre os isolados. Hovanec e Delong (1996) pesquisando sobre bactérias nitrificantes associadas à água doce e marinha isolaram estirpes das espécies: *Alcaligenes eutrophus*, *A. faecalis* e *Paracoccus denitrificans*. No presente trabalho estes dois gêneros também foram isolados.

O gênero *Arthrobacter* é constituído por bactérias heterotróficas nitrificantes que usam o carbono como fonte de energia extraído da matéria orgânica. Membros desse gênero compõem um grupo predominante de microrganismos encontrados nos solos do mundo todo, tendo sido isoladas de cavernas subterrâneas, de geleiras, em solos da Antártica, de sedimentos da costa do Atlântico e dos sedimentos de vulcões. Essas bactérias utilizam uma grande variedade de compostos orgânicos, incluindo hidrocarbonetos aromáticos. Acredita-se que estes microrganismos têm uma contribuição muito grande na degradação da matéria orgânica em todo o mundo, mas são poucos os estudos sobre o gênero *Arthrobacter* relacionada ao meio ambiente, existindo mais estudos clínicos (SIEBERT; HIRSCH, 1988; HALDEMAN *et al.*, 1993; EKENDAHL *et al.*, 1994; BALKWILL; BOONE, 1997).

O gênero *Alcaligenes* foi descoberto em 1919. É formado por bacilos Gram-negativos finos, móveis por meio de flagelos peritríquios. Todas as espécies são tipicamente oxidase (+) e catalase (+), crescendo bem em ágar Mac Conkey. Com exceção de *A. xylosoxidans*, todas as outras espécies são assacarolíticas. Essas bactérias têm a capacidade de degradar compostos aromáticos e fenol para obter energia. São isoladas de vários locais, incluindo solos e ambientes aquáticos, onde uma espécie a *A. denitrificans* tem sido conhecida como inibidora do crescimento de certos tipos de algas. Esta espécie é aeróbia, não fermentadora de glicose. Possuem motilidade, degradam a xilose e compostos nitrogenados. São isoladas de vários ambientes e fontes de águas residuais (GLUPCZYNSKI *et al.*, 1988; MENEZES; NEUFELD, 2006; ESSAM *et al.*, 2010).

A espécie *A. faecalis* é a mais comumente isolada, é tipicamente encontrada no solo e em águas contaminadas de diversos ambientes. Produz fortes reações alcalinas em meio OF e reduz nitritos a nitrogênio gasoso, podendo crescer em caldo contendo 6,5% de NaCl. Está subdividida em *A. faecalis subsp. faecalis* e *A. faecalis subsp. Parafaecalis* (SCHROLL *et al.*, 2001). Recentemente, outra nova subespécie a *A. faecalis subsp. Phenolicus* foi isolada de águas cinzentas de um bioprocessador (REHFUSS; URBAN, 2005).

Outros gêneros encontrados foram: *Flavobacterium* (7,3%), *Achromobacter* (4,9%), *Brevibacterium* (4,9%) e *Proteus* (2,44%) (Figura 12).

Tem-se dado uma atenção especial para a nitrificação heterotrófica e a desnitrificação aeróbia, por causa da sua contribuição para o ciclo do nitrogênio no ambiente e a possibilidade de sua aplicação no tratamento de águas residuárias (MATSUZAKA *et al.*, 2003).

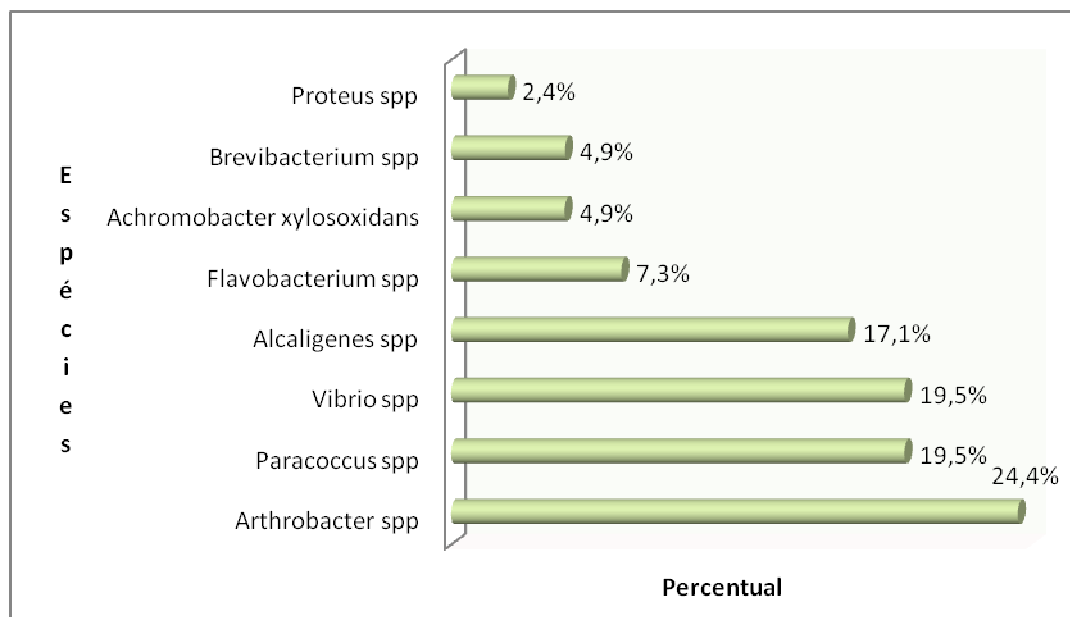


Figura 12 – Percentual de espécies de bactérias nitrificantes identificadas de amostras da água do sistema fechado de cultivo de peixes marinhos.

Das colônias crescidas em TCBS foram isoladas e identificadas espécies da família Vibrionaceae. Dos 28 isolados, foram identificados 20 e somente uma não pertencia ao gênero *Vibrio*. Os isolados se distribuíram em 9 espécies de *Vibrio* e uma de *Photobacterium* (Tabela 6).

Tabela 6 – Identificação de estirpes bacterianas da família Vibrionaceae isoladas sobre meio seletivo para víbrios (ágar TCBS) inoculado com amostras de água de um sistema fechado de cultivo de peixes marinhos.

Identificação	Número de isolados
<i>Photobacterium leiognathi</i>	1
<i>V. alginolyticus</i>	1
<i>V. calviensis</i>	1
<i>V. corallilyticus</i>	9
<i>V. mediterranei</i>	1
<i>V. metschnikovii</i>	2
<i>V. mimicus</i>	1
<i>V. orientalis</i>	2
<i>V. vulnificus B₂</i>	1
<i>V. vulnificus B₃</i>	1
Total de isolados	28
Total de isolados identificados	20

A espécie com maior percentual de isolamento foi *V. coralliilyticus* (45%). Essa espécie de *Vibrio* foi isolada primeiramente de corais doentes da espécie *Pollicopora damicornis* no Oceano Índico por Ben-Haim *et al.* (2003). A partir de então, ele já foi isolado em diversos tipos de ambientes (MUNN; MARCHANT; MOODY, 2008; ROCHA, 2008; CARVALHO, 2009), porém até o momento sua presença não foi relacionada a evento de doença em organismos aquáticos cultivados.

V. coralliilyticus se adere aos recifes de corais, sendo patogênicos e sua virulência aumenta proporcionalmente com o aumento da temperatura (MUNN; MARCHANT; MOODY, 2008).

Outras espécies identificadas foram: *V. orientalis* (10%), *V. metschnikovii* (10%), *V. mediterranei* (5%), *V. vulnificus* B₂ (5%), *V. vulnificus* B₃ (5%), *V. alginolyticus* (5%), *V. mimicus* (5%) e *V. calviensis* (5%) (Figura 13).

V. alginolyticus e o *V. metschnikovii* são patogênicos para os organismos marinhos e para os seres humanos. Causam infecções nos ferimentos expostos em águas marinhas contaminadas, podendo ocasionar septicemia ou até a morte (OZER *et al.*, 2008).

Menezes (2005) em sua pesquisa sobre a diversidade de *Vibrio spp.* em estuários no Estado do Ceará associada à atividade de carcinicultura, isolou *V. mimicus*, *V. metschnikovii*, *V. alginolyticus* e *V. vulnificus*, encontrados também no presente estudo. As estirpes das espécies de *Vibrio*: *V. coralliilyticus*, *V. alginolyticus*, *V. mediterranei*, *V. mimicus*, *V. vulnificus* e *V. orientalis* também foram identificadas em uma pesquisa realizada por Carvalho (2009) sobre a quantificação e identificação de *Vibrio spp.* na hemolinfa de camarões cultivados em fazendas no Estado do Ceará.

A espécie de *Vibrio vulnificus* é subdividida em três biótipos com bases diferenciadas em relação às propriedades bioquímicas. O biótipo 1 (BT1) e o 3 (BT3) são considerados patogênicos para os seres humanos e o biótipo 2 é patogênico para os organismos aquáticos, apesar de já terem sido relatados diversos casos no mundo todo de infecções humanas provenientes do biótipo 2 (BISHARAT *et al.*, 2007). Neste trabalho foram identificados os biótipos 2 e 3. Cañigral *et al.* (2009) identificaram espécies de *V. vulnificus* em frutos do mar, em água marinha e em efluentes das áreas da costa do Mediterrâneo.

O gênero *Photobacterium* pertence à família Vibrionaceae, são gram-negativas, anaeróbicas facultativas, encontrada comumente em ambientes marinhos e na superfície intestinal dos organismos marinhos. Vivem em simbiose com estes organismos, são

bioluminescentes e muitas espécies têm a habilidade de emitir luz como *Photobacterium leiognathi* e *P. phosphoreum* (MADIGAN; MARTINKO, 2006).

O primeiro isolamento da *P. leiognathi* foi feito por Boisvert, Chatelan e Bassot (1967) em peixe luminescente (*Leiognathus equula*). Essa bactéria também já foi relacionada como patógeno de peixes nas pisciculturas do Japão. Altas taxas de mortalidade foram observadas em populações de peixes de *Morone americanus* e *Morone saxatilis* nos Estados Unidos (FOUZ *et al.*, 1998).

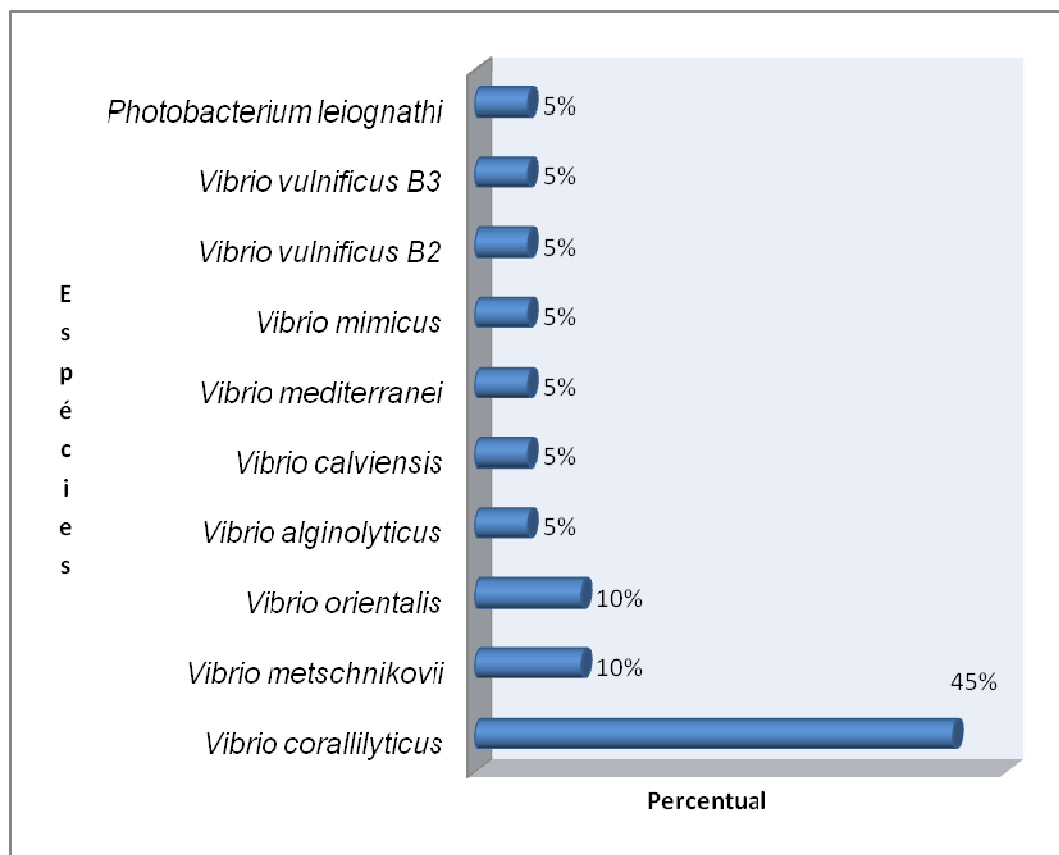


Figura 13 – Percentual de isolamento de bactérias pertencentes à família Vibrionaceae das amostras de água dentro do sistema de cultivo de peixes marinhos.

O cultivo de organismos aquáticos intensivo, sem manejo adequado cria condições que favorecem ao aparecimento e o desenvolvimento de patógenos. Como profilaxia os aquicultores têm utilizado produtos químicos de forma indiscriminada. Devido à água utilizada no cultivo de uma forma geral provir de cursos de água e serem devolvidas após seu uso, estes produtos podem ser transportados e causar impactos diversos em outros ambientes (MAXIMIANO *et al.*, 2005).

Assim, é importante estabelecer o comportamento de bactérias potencialmente patogênicas frente a drogas antimicrobianas, de modo a se produzir bases para as tomadas de decisões durante os possíveis eventos de doenças que venham a acometer os organismos cultivados.

Dos isolados de TCBS testados frente a 13 antimicrobianos pertencentes a nove classes diferentes, foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 7. Todos foram sensíveis ao sulfazotrim, ao cloranfenicol, a estreptomicina, oxitetraciclina e a nitrofurantoina. Li *et al.* (1999) obtiveram o mesmo resultado com a estreptomicina em *Vibrio* isolados do cultivo de *Sea Brem (Sparus sarba)* em Hong Kong. Nas espécies de *Vibrio spp* isoladas de robalos (*Dicentrarchus labrax*) por Saavedra *et al.* (2004) todas apresentaram resistência a estreptomicina, um antimicrobiano pertencente à classe dos aminoglicosídeos.

Tabela 7 – Padrão de comportamento frente a antimicrobianos em bactérias da família Vibrionaceae isoladas em amostras de água de um sistema fechado de cultivo de peixes marinhos.

Código Cepas	Identificação	Perfil		
		Sensível	Intermediário	Resistente
V01	<i>Photobacterium leiognathi</i>	AMP, NIT, EST, GEN, CFL, CTX, TET, CLO, FLF, NAL, CIP, SUT, OXI.		
V02	<i>V. alginolyticus</i>	NIT, EST, GEN, CFL, CTX, TET, CLO, FLF, NAL, CIP, SUT, OXI.		AMP
V03	<i>V. calviensis</i>	AMP, NIT, EST, GEN, CFL, TET, CLO, FLF, CIP, SUT, OXI.		CTX, NAL
V04	<i>V. corallilyticus</i>	AMP, NIT, EST, GEN, CFL, TET, CLO, FLF, CIP, SUT, OXI.		CTX, NAL
V05	<i>V. corallilyticus</i>	AMP, NIT, EST, CTX, TET, CLO, FLF, NAL, CIP, SUT, OXI.		GEN, CFL
V06	<i>V. corallilyticus</i>	AMP, NIT, EST, GEN, CFL, CTX, TET, CLO, FLF, NAL, CIP, SUT, OXI.		
V07	<i>V. corallilyticus</i>	AMP, NIT, EST, GEN, CFL, CTX, TET, CLO, FLF, NAL, CIP, SUT, OXI.		
V08	<i>V. corallilyticus</i>	AMP, NIT, EST, GEN, CFL, TET, CLO, FLF, CIP, SUT, OXI.		CTX, NAL
V09	<i>V. corallilyticus</i>	AMP, NIT, EST, GEN, CFL, CTX, TET, CLO, FLF, NAL, CIP, SUT, OXI.		
V10	<i>V. corallilyticus</i>	AMP, NIT, EST, GEN, CFL, TET, CLO, FLF, SUT, OXI.	CIP	CTX, NAL
V11	<i>V. corallilyticus</i>	NIT, EST, GEN, CFL, CTX, TET, CLO, FLF, SUT, OXI.	CIP	AMP, NAL
V12	<i>V. corallilyticus</i>	AMP, NIT, EST, GEN, CFL, CTX, TET, CLO, FLF, NAL, CIP, SUT, OXI.		
V13	<i>V. mediterranei</i>	AMP, NIT, EST, GEN, CFL, CTX, TET, CLO, FLF, NAL, CIP, SUT, OXI.		
V14	<i>V. metschnikovii</i>	NIT, EST, GEN, CFL, CTX, TET, CLO, FLF, CIP, SUT, OXI.		AMP, NAL
V15	<i>V. metschnikovii</i>	AMP, NIT, EST, GEN, CFL, TET, CLO, FLF, CIP, SUT, OXI.		CTX, NAL
V16	<i>V. mimicus</i>	AMP, NIT, EST, GEN, CFL, CTX, TET, CLO, FLF, NAL, CIP, SUT, OXI.		
V17	<i>V. orientalis</i>	AMP, NIT, EST, GEN, CFL, CLO, SUT, OXI.	CIP	CTX, TET, FLF, NAL
V18	<i>V. orientalis</i>	NIT, EST, GEN, CFL, CTX, TET, CLO, FLF, NAL, CIP, SUT, OXI.		AMP
V19	<i>V. vulnificus B₂</i>	NIT, EST, GEN, CFL, CTX, TET, CLO, FLF, NAL, CIP, SUT, OXI.		AMP
V20	<i>V. vulnificus B₃</i>	NIT, EST, GEN, CFL, CTX, TET, CLO, FLF, NAL, CIP, SUT, OXI.		AMP

Legenda: Ampicilina (AMP) (10µg), nitrofurantoina (NIT) (300µg), estreptomicina (EST) (10µg), gentamicina (GEN) (10µg), cefalotina (CFL) (30µg), cefotaxima (CTX) (30µg), tetraciclina (TET) (30µg), cloranfenicol (CLO) (30µg), florfenicol (FLF) (30mg), ácido nalidixico (NAL) (30µg), ciprofloxacino (CIP) (5µg), sulfazotrim (SUT) (25mg).

Entre a microbiota de víbrios da água, no sistema de cultivo, foram encontrados 40% das estirpes resistentes ao ácido nalidíxico, 30% a cefotaxima e a ampicilina, 5% ao florfenicol, tetraciclina, cefalotina e gentamicina. Observou-se assim, resistência das cepas às classes dos

antimicrobianos: Quinolona, Cefalosporina, Aminopenicilina, Cloranfenicol, Tetraciclina e Aminoglicosídeos, foram 15% intermediário a ciprofloxacina (Figura 14). A cepa de *V. alginolyticus* foi resistente a ampicilina e sensível ao restante dos antimicrobianos testados. Ozer *et al.* (2008) obtiveram o mesmo resultado de resistência com essa espécie isolada de cavalos marinhos, sendo sensível, também, ao ácido nalidíxico, a tetraciclina, a cefotaxima e ao cloranfenicol. Ottaviani *et al.* (2001) analisando frutos do mar, encontraram 50% das estirpes de *V. alginolyticus* resistentes a penicilina, carbenicilina e ampicilina, sendo todos esses antimicrobianos pertencentes à classe das Aminopenicilinas.

Não existem relatos de pesquisas sobre antibiograma realizadas com o *V. coralliilyticus* (GEFFEN; ROSENBERG, 2005). Na presente pesquisa o total de isolados desta espécie (09), foram sensíveis a estreptomicina, a tetraciclina, a nitrofurantoina, a oxitetraciclina, ao florfenicol, ao cloranfenicol e ao sulfazotrim, sendo resistentes 44,45% ao ácido nalidíxico, 33,35% a cefotaxima e 11,12% a ampicilina, a gentamicina e a cefalotina.

V. mimicus foi sensível a todos os antimicrobianos utilizados neste trabalho. Na pesquisa realizada por Adeleye *et al.* (2008), sobre a susceptibilidade dos vibrios halofílicos potencialmente patogênicos isolados de alimentos marinhos o *V. mimicus* foi sensível também ao ciprofloxacino, porém resistente a nitrofurantoina e ao cloranfenicol.

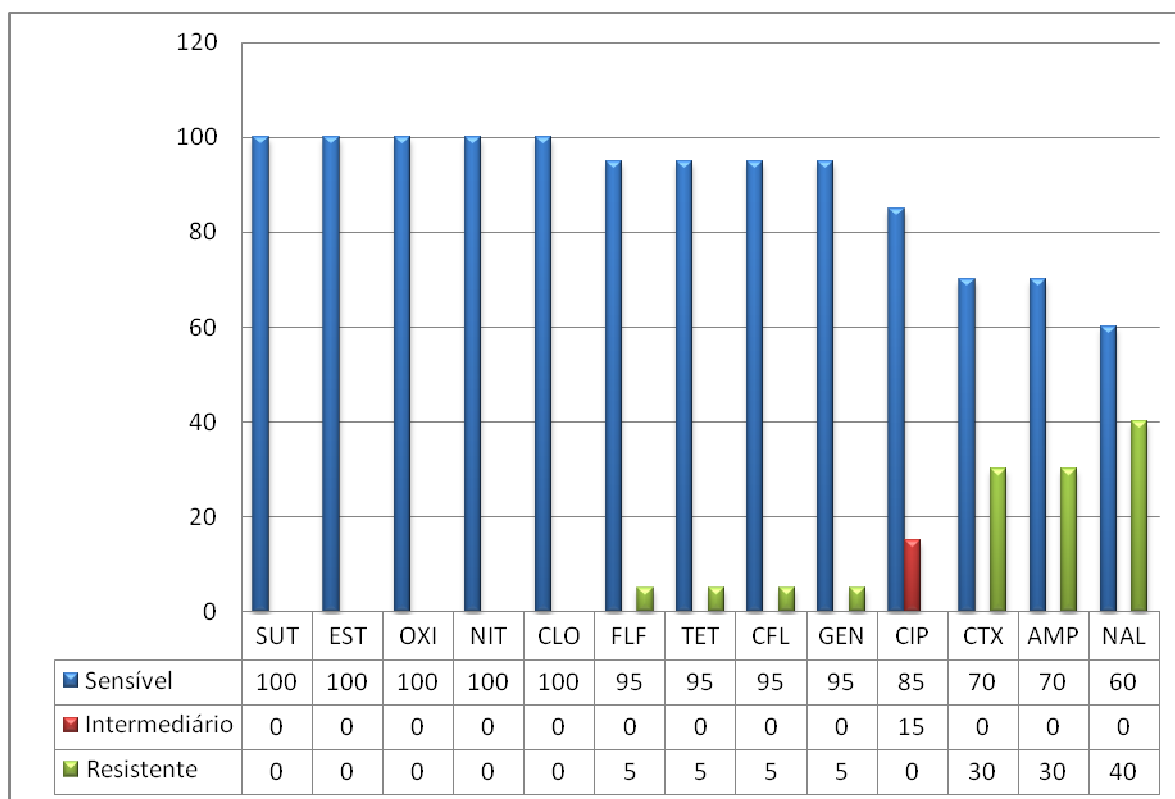
Os dois isolados da espécie *V. metschnikovii* foram resistentes ao ácido nalidíxico. Uma delas (V14) foi resistente a ampicilina e a outra V15 a cefotaxima. Foram sensíveis aos demais antibióticos. Blanch *et al.* (2008) observaram resistência ao antimicrobianos da classe Quinolona entre estirpes de vibrio desta espécie isoladas de peixes marinhos.

A espécie *V. vulnificus* foi resistente somente a ampicilina, sendo sensível aos demais antimicrobianos. Nascimento *et al.* (2001) obtiveram o mesmo resultado de resistências com essa espécie isolada de camarões cultivados, quando também foi sensível a nitrofurantoina, ao ciprofloxacino, a gentamicina e ao cloranfenicol. Yanling *et al.* (2006) observaram a resistência dessa mesma espécie em relação a antimicrobianos da classe Aminopenicilina em estirpes isoladas das amostras de águas marinhas em Hong Kong.

Photobacterium leiognathi foi sensível a todos os antibióticos utilizados nesta pesquisa.

O uso prolongado de determinado antimicrobiano pode levar ao surgimento de cepas resistentes em organismos cultivados, podendo também aumentar a resistência em estirpes do

ambiente, sendo assim refletido o padrão de resistência antimicrobiana pelo uso frequente desses medicamentos (TENDENCIA; PEÑA, 2002).



Legenda: Ampicilina (AMP) (10µg), nitrofurantoina (NIT) (300µg), estreptomicina (EST) (10µg), gentamicina (GEN) (10µg), cefalotina (CFL) (30µg), cefotaxima (CTX) (30µg), tetraciclina (TET) (30µg), cloranfenicol (CLO) (30µg), florfenicol (FLF) (30mg), ácido nalidixico (NAL) (30µg), ciprofloxacino (CIP) (5µg), sulfazotrim (SUT) (25mg).

Figura 14 – Perfil de sensibilidade/resistência das cepas da família Vibriaceae isoladas de amostras de águas do sistema de cultivo de peixes marinhos.

A importância do estudo sobre a resistência a antimicrobianos refere-se ao fator de risco, constituído no agravamento de uma patologia infecciosa. A abordagem da resistência aos antimicrobianos constitui um dos parâmetros, para definir o grau de importância de uma linhagem bacteriana associada a uma patologia (VON BAUM; MARRE, 2005).

Na Tabela 8 são mostrados os resultados relacionados às estirpes isoladas de *Vibrio* que apresentaram perfil de múltipla resistência. O perfil mais frequente entre os isolados foi a resistência a CTX-NAL (44,5%) (4/9).

Tabela 8 – Perfil de multi-resistência dos isolados bacterianos das amostras de água de um sistema fechado de cultivo de peixes marinhos.

Código Cepas	Identificação	Perfil de resistência
V03	<i>Vibrio calviensis</i>	CTX, NAL
V04	<i>Vibrio coralliilyticus</i>	CTX, NAL
V05	<i>Vibrio coralliilyticus</i>	GEN, CFL
V08	<i>Vibrio coralliilyticus</i>	CTX, NAL
V10	<i>Vibrio coralliilyticus</i>	CTX, NAL, CIP
V11	<i>Vibrio coralliilyticus</i>	AMP, NAL, CIP
V14	<i>Vibrio metschnikovii</i>	AMP, NAL
V15	<i>Vibrio metschnikovii</i>	CTX, NAL
V17	<i>Vibrio orientalis</i>	CTX, TET, FLF, NAL, CIP

Legenda: Ampicilina (AMP) (10µg), gentamicina (GEN) (10µg), cefalotina (CFL) (30µg), cefotaxima (CTX) (30µg), tetraciclina (TET) (30µg), florfenicol (FLF) (30mg), ácido nalidíxico (NAL) (30µg), ciprofloxacino (CIP) (5µg).

Do total de estirpes isoladas, nove (45%) (9/20) se mostraram com um perfil de resistência múltipla a sete classes diferentes de antimicrobianos (Aminopenicilina, Aminoglicosídeo, Cefalosporina, Tetraciclina, Cloranfenicol, Fluorquinolona e Quinolona), onde 88,89% (8/9) das cepas foram resistentes a 3 classes e 11,11% (1/9) resistentes a 4 classes. Neste estudo foram observados seis perfis de multi-resistência, sendo estes: CTX-NAL, GEN-CFL, CTX-NAL-CIP, AMP-NAL-CIP, AMP-NAL, CTX-TET-FLF-NAL-CIP. Ottaviani *et al.*(2001) também encontram resistência múltipla às classes: Aminopenicilina, Cefalosporina, Tetraciclina e Quinolona em estirpes de *Vibrio* isoladas de frutos do mar.

As estirpes da espécie *Vibrio coralliilyticus* apresentaram a maior frequência de multi-resistência entre os isolados, sendo resistente a seis antimicrobianos das classes: Cefalosporina, Quinolonas, Aminoglicosídeos e Aminopenicilina. A incidência de múltipla resistência foi observada por Sarter *et al.* (2007) ao pesquisar o perfil de resistência em isolados de 3 fazendas de cultivo de *catfish* no Vietnã, encontrando estirpes de *Vibrio* com resistência múltipla a AMP-OTC-SXT-NAL e AMP-NIT-OTC.

Em estudos realizados por Costa (2006) sobre o perfil de resistência de 39 estirpes de *Vibrio* isoladas de amostras de água do cultivo de organismos aquáticos, foi observada a resistência múltipla em 15,38% das cepas, sendo 5 resistentes a dois antimicrobianos e 1 resistente a três antimicrobianos.

Estudos sobre a ocorrência de resistência múltipla aos antimicrobianos em estirpes isoladas do gênero *Vibrio* tem uma importância vital para diversificar os conhecimentos científicos em relação à resistência bacteriana, o uso de drogas e seus efeitos sobre a terapia em organismos aquáticos, bem como em doenças humanas (MANJUSHA *et al.*, 2005).

As bactérias estão expostas a uma ampla gama de alterações físico-químicas envolvendo temperatura, pH, concentração de oxigênio, disponibilidade de nutrientes, compostos tóxicos, etc. Cada grupo bacteriano, entretanto tem as suas condições ideais que lhe proporcionam um melhor crescimento e permitem a máxima sobrevivência. Alterações nessas condições requerem adaptação imediata com o intuito de assegurar a sobrevivência da população. Para se adaptar, a bactéria produz um componente estrutural ou funcional que lhe garante a sobrevivência em diferentes condições ambientais. O desenvolvimento de novos componentes requer a expressão de genes que antes não estavam sendo transcritos, pois até o momento estes componentes não estavam sendo necessários à sobrevivência celular. Sendo assim, as características fenotípicas de uma bactéria são determinadas pelo seu genótipo e por certas condições ambientais (OLIVEIRA, 2005).

Na Tabela 9 observa-se a representação dos resultados obtidos pelo processo de cura plasmidial dos isolados bacterianos com fenótipo de multi-resistência. Pode-se verificar que antes do processo de “cura de plasmídeo” a resistência a CTX-NAL e AMP foram os perfis mais comuns, com percentuais de 33,33% entre as cepas. Após o processo de “cura” foi observado que a resistência a AMP foi perdida em todas as cepas e a resistência ao CTX foi perdida somente na estirpe da espécie *V. metschnikovii* (16,67%), para o NAL a resistência continuou em 42,87% das estirpes. Isto sugere que a característica fenotípica estava relacionada à presença de plasmídeo em todos os isolados em relação ao antimicrobiano AMP, podendo a resistência de 83,33% e 57,13% das estirpes isoladas está relacionada à característica cromossômica em relação aos antimicrobianos CTX e NAL, respectivamente.

Tabela 9 – Comportamento dos isolados bacterianos das amostras de água de um sistema fechado de cultivo de peixes marinhos com perfil de resistência submetidos à técnica de cura de plasmídeo.

Código Cepas	Identificação	Perfil de resistência	
		Antes da “cura”	Após a “cura”
V02	<i>V. alginolyticus</i>	AMP	
V03	<i>V. calviensis</i>	CTX, NAL	CTX
V04	<i>V. corallilyticus</i>	CTX, NAL	CTX
V05	<i>V. corallilyticus</i>	GEN, CFL	
V08	<i>V. corallilyticus</i>	CTX, NAL	CTX, NAL
V10	<i>V. corallilyticus</i>	CTX, NAL, CIP	CTX, NAL
V11	<i>V. corallilyticus</i>	AMP, NAL, CIP	NAL
V15	<i>V. metschnikovii</i>	CTX, NAL	
V17	<i>V. orientalis</i>	CTX, NAL, TET, FLF	CTX
V18	<i>V. orientalis</i>	AMP	
V19	<i>V. vulnificus B₂</i>	AMP	
V20	<i>V. vulnificus B₃</i>	AMP	

Legenda: Ampicilina (AMP) (10µg), gentamicina (GEN) (10µg), cefalotina (CFL) (30µg), cefotaxima (CTX) (30µg), tetraciclina (TET)(30µg), florfenicol (FLF) (30mg), ácido nalidíxico (NAL) (30µg), ciprofloxacino (CIP) (5µg).

A resistência aos antimicrobianos CTX, NAL foi o padrão mais comum entre as cepas multi-resistentes. Após o procedimento de “cura” pode-se observar que a resistência de *V. metschnikovii* a CTX e NAL estava relacionada à presença de plasmídeo enquanto que a das cepas de *V. corallilyticus* (V08 e V10) aos mesmos antimicrobianos se mostrou como uma característica cromossômica. Manjusha *et al.* (2005) observaram a resistência de *Vibrio spp* isolados de amostras de água marinha coletadas das fazendas de carcinicultura na Índia a ampicilina, gentamicina, ácido nalidíxico e a tetraciclina.

Uma cepa de *V. orientalis* (V17) foi resistente a quatro dos treze antimicrobianos testados, entretanto, depois da “cura” essa resistência somente permaneceu para o CTX, podendo ser a resistência aos outros antimicrobianos uma característica plasmidial. Radus *et al.*(2000) não observaram em víbrios resistência a antimicrobianos relacionados a plasmídios. Semelhante às conclusões de Jun *et al.* (2003), que relacionaram pouca resistência a antimicrobianos versus plasmídeo entre 51 estirpes da espécie *Vibrio* isoladas de frutos do mar cultivados em Hong Kong. Estudando o perfil de resistência aos antimicrobianos de *Vibrio* isolados da água de viveiros e de camarões cultivados em fazenda no Estado do Ceará, Rebouças (2008) encontrou 54,54% dos seus isolados com resistência relacionada a característica cromossômica.

Foi observado nesta pesquisa que a resistência das cepas aos antimicrobianos das classes: Aminopenicilina, Aminoglicosídeos, Fluorquinolona, Tetraciclina e Cloranfenicol; podem estar relacionada à característica plasmidial.

Os genes existentes nos plasmídios apenas conferem vantagens adaptativas para as bactérias, não sendo vitais para a sua sobrevivência. A classificação dos plasmídios pode ser de acordo com o seu caráter fenotípico que asseguram à bactéria ou possibilitam o poder de transferência de uma célula bacteriana a outra. Diversos plasmídios e *transposons* carregam múltiplos genes de resistência, que confere resistência a diferentes antimicrobianos, e a seleção de qualquer determinante pode conservar a resistência e a integridade do plasmídio (LIVERMORE, 2003).

No sistema aquático, os fatores ambientais desempenham um papel importante na distribuição das bactérias, entretanto, nos ambientes de cultivo de organismos aquáticos, esses fatores são controlados e essa influência é minimizada. A variação na composição e densidade da microbiota e dos parâmetros abióticos contribuem para produzir um sistema mais estável. Sendo assim, os parâmetros bacteriológicos da água em um sistema fechado de cultivo são fundamentais para assegurar a saúde dos animais evitando impactos negativos no cultivo e dos seus efluentes sobre o ambiente. É importante a detecção e avaliação de grupos bacterianos com potencial benéfico para o ambiente, bem como daqueles com potencial patogênico para os animais dentro deste sistema permitindo um gerenciamento adequado que garanta a qualidade da água e, por consequência, do pescado cultivado.

6 – CONCLUSÕES

- Os parâmetros físico-químicos no sistema fechado de cultivo com tratamento de água se mantiveram dentro dos padrões estabelecidos pela Resolução 357 do CONAMA para os corpos de água destinados a pesca ou cultivo de organismos aquáticos;
- O sistema fechado de tratamento da água do cultivo se mostrou eficiente no que diz respeito à manutenção da qualidade bacteriológica da água, sendo a etapa de cloração suficiente para a redução significativa do número de bactérias indicadoras de contaminação fecal presentes nas águas do rio de captação. Sendo assim, os níveis de coliformes encontrados permaneceram dentro dos padrões permitidos pela legislação brasileira para os corpos de água destinados a pesca ou cultivo de organismos aquáticos;
- O número e diversidade de espécies bacterianas heterotróficas nitrificantes encontradas dentro do sistema de cultivo foi um bom indicativo da estabilidade da qualidade da água;
- Foi possível verificar a presença de cepas de *Vibrio* com resistência a múltiplos antimicrobianos dentro do sistema fechado de cultivo de peixes marinhos. O perfil de resistência deve estar relacionado à microbiota da água do cultivo, visto que não são utilizados antimicrobianos nessa piscicultura. Também foi possível verificar, que na maioria dos casos, essa característica esteve relacionada à presença de plasmídeo;

7 – CONSIDERAÇÃO FINAL

O cultivo de peixes marinhos em sistemas fechados de tratamento de água no Brasil ainda está em etapa experimental, por isso estudos sobre a diversidade da microbiota com particular atenção às populações de *Vibrio* nestes ambientes são de extrema importância para o prognóstico de doenças bacterianas. Pesquisas sobre os grupos funcionais, como bactérias nitrificantes, entre a população de bactérias heterotróficas dentro do sistema de cultivo de organismos marinhos são importantes para o estabelecimento de parâmetros biológicos que possam auxiliar no gerenciamento do cultivo garantindo a sustentabilidade da atividade.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, T.J.; GHOSH, S.; NAGESH, T.S.; SASMAL, D. Distribution of bacteria involved in nitrogen and sulphur cycles in shrimp culture systems of West Bengal, India. **Aquac.**, Amsterdam, v. 239, n. 4, p. 275-288, 30 set. 2004.
- ABREU, L. M. Aspectos Microbiológicos de los Procesos de Nitrificación-Desnitrificación. In: **Anais do III Taller Y Seminario Latino Americano: Tratamiento Anaerobio de águas Residuale**, 1994. Uruguai, Montevideu, 1994. p. 55-64.
- ADELEYE, A.; VIVIAN, E.; RITA, N.; STELLA, S. E.; EMMANUEL, O. Antimicrobial susceptibilty of potentially pathogenic halophilic vibrio species isolated from seafoods in Lagos, Nigeria. **J. Biotechnol.**, Amsterdam, v. 7, n. 20, p. 3791-3794, oct. 2008.
- ANA – Agência Nacional das águas. **Lei nº 9.433, de 8 de janeiro de 1997**. Institui a Política Nacional de Recursos Hídricos, cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos, regulamenta o inciso XIX do art. 21 da Constituição Federal, e altera o art. 1º da Lei nº 8.001, de 13 de março de 1990, que modificou a Lei nº 7.990, de 28 de dezembro de 1989. Disponível em: www.ana.gov.br/Institucional/Legislacao/leis/lei9433.pdf. Acesso em: 17 abr. 2010.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos e Alimentação**. Boletim mensal com os destaques da internet, Brasília, v. 3, 2009. 2 p. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 22 jan. 2010.
- AGNESE, A.P.; OLIVEIRA, V.M.; SILVA, P.P.O.; SILVA, P.P.O.; OLIVEIRA, G.A. Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e enumeração de coliformes totais e fecais, em peixes frescos comercializados no município de Seropédica - RJ. **Hig. Aliment.**, São Paulo, v. 15, n. 88, p. 67-70, set. 2001.
- ALCINA, M.; BLANCH, A.R. A set of key biochemical identification of environmental Vibrio species. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v. 76, n. 1, p. 79-85, jan. 1993.
- ALDERMAN, D. J.; HASTINGS, T. S. Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance-potencial for consumer health risks. **Int. J. Food Sci. Technol.**, Oxford, v. 33, n. 4 p. 139-155, apr. 1998.
- APHA - American Public Health Association. **Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater**. 19 ed. American Public Health Association. 2000. p.1-10.

ARCEIVALA, S. J. **Wasterwater Treatment and Disposal**. Serie: Pollution engineering and technology, Nova York, v.3, dec. 1981. 891p.

AVNIMELECH, Y. Minimal discharge from intensive fish ponds. **World Aquac.**, Baton Rouge, v. 1, n. 2 p. 32-37, feb. 1998.

BALDISSEROTO, B. **Fisiologia de Peixes Aplicada à Piscicultura**. Rio Grande do Sul: Editora da UFSM, 2002. p. 203.

BALKWILL, D. L.; BOONE, D. R. Identity and diversity of microorganisms cultured from subsurface environments. In: **The Microbiology of the Terrestrial Deep Subsurface**. Edited by P. S. Amy; D. L. Haldeman. New York: Lewis Publishers, p. 105-117. 1997.

BARG, U. C. **Orientaciones para la promoción de la ordenación medioambiental del desarrollo de la acuicultura costera**. FAO Documento Técnico de Pesca, Roma, n. 328, 1994. p.138.

BEN-HAIM, Y.; THOMPSON, F. L.; THOMPSON, C. C.; CNOCKAERT, M.C.; HOSTE, B.; SWINGS, J.; ROSENBERG, E. *Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Inglaterra, v. 53, n. 1, p. 309–315, jan. 2003.

BERNARDES, M. V. S.; MESQUITA, A. J.; NUNES, I. A.; SILVA, P. C.; EUNICE, R. R.; MARQUES, L. R. S. Avaliação de três diferentes sanitizantes em viveiros de piscicultura pela contagem de bactérias do gênero *Aeromonas*. **Cienc. Anim. Bras.**, Goiania, v. 4, n.1, p. 69-83, jan./jun. 2003.

BISHARAT, N.; AMARO, C.; FOUZ, B.; LLORENS, A.; COHEN, D. I. Serological and molecular characteristics of *Vibrio vulnificus* biotype 3: evidence for high clonality. **Microbiol.**, Inglaterra, v. 153, n.3, p. 847–856, mar. 2007.

BITTON, G. Wasterwater Microbiology. In: **Role of Microorganisms in Biogeochemical Cycles**. Estados Unidos, 1994. p. 51-73.

BLANCH, A. R; HISPANO, C.; BULTO, P.; BALLESTE, E.; GONZA´ LEZ-LO´ PEZ, J.J.; VILANOVA1, X. Comparison of *Vibrio* spp. populations found in seawater, in exhibition aquaria, in fish intestine and in fish feed. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.106, n. 1, p. 57-65, nov. 2008.

BOISVERT, H.; CHATELAN, R. E.; BASSOT, J. M. Étude d' un Photobacterium isolé de l' organe lumineux de poissons *Leionathidae*. **Ann. Inst. Pasteur. Microbiol.**, Paris, v. 112, p. 520-524. 1967.

BORGHETTI, N. R. B.; OSTRENSKY A.; BORGHETTI, J. R. **Aqüicultura: uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo**. 2003. 128 p.

BOTHE, H. H.; JOST, M.; SCHLOTTER, B. B. Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. **FEMS Microbiol.**, Amsterdam, v. 24, n. 5, p. 673-690, dec. 2000.

BOYD, C. E. **Manejo da qualidade da água na aquicultura e no cultivo do camarão marinho**. Manual n. 2. A qualidade da água para aquicultura de viveiros. Associação brasileira de criadores de camarões – ABCC, Universidade de Auburn, Alabama, 1999. 157p.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial da União** (Dispõe sobre a classificação dos corpos de água diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências), 18 mar. 2005. Seção 1, p. 58-63.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 274, de 29 de novembro de 2000.

BRAZ FILHO, M. S. P. **Qualidade na Produção de Peixes em Sistema de Recirculação de Água**. 2000. 41f. Monografia (Pós-Graduação em Qualidade nas Empresas) Centro Universitário, São Paulo. 2000.

BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T. **Biology of Microorganisms**. New York, 6. ed. 1991. 316p.

CAMARGO, S. G. O.; POUHEY, J. L. O. F. Aquicultura - um mercado em expansão. **Rev. Bras. Agrocienc.**, Pelotas, v. 11, n. 4, p. 393-396, out./dez. 2005.

CAÑIGRAL, I.; MORENO, Y.; ALONSO, J.; GONZALEZ, L.; FERRUS, M. Detection of *Vibrio vulnificus* in seafood, seawater and wastewater samples from a Mediterranean coastal área. **Microbiol. Res.**, Jena, v. 44, n. 8, p. 1-8, nov. 2009.

CARVALHO, E. M. R. **Quantificação e identificação de *Vibrio* spp. na hemolinfa de camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados em fazendas no Estado do Ceará.** 2009. 89 f. Dissertação. (Mestrado em Engenharia de Pesca) Programa de Pós-graduação stricto sensu em Engenharia de Pesca – Universidade Federal do Ceará. 2009.

CARVALHO, F. C. T. **Influências exógenas na qualidade bacteriológica da água, solo e camarão (*Litopenaeus vannamei*), em quatro fazendas de camarão do Estado do Ceará.** 2006. 87 f. Dissertação. (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) Programa de Pós-graduação stricto sensu em Ciências Marinhas Tropicais – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2006.

CLSI - **Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 19. ed., CLSI/NCCLS M100-S19. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2009.

COCHAVA, M.; DIAB, S.; AVNIMELECH, Y. MIRES, D.; AMIT, Y. **Intensive growth of fish with minimal water exchange.** Documento: Breeding Tropical Fish., Israel, p. 174-181. 1990.

COLT, J.; LAMOUREUX, J.; PATTERSON, R.; ROGERS, G. Reporting standards for biofilter performance studies. **Aquac. Eng.** Essex, v. 34, n. 3, p. 377 – 388, may. 2006.

COLWELL, R. R. A global and historical perspectives of the Genus *Vibrio*. In: THOMPSON, F.L.; AUSTIN, B.; SWINGS, J. First International Conference on the Biology of Vibrios. **J. Am. Soc. Microbiol.**, Washington, v. 188, n. 13, p. 4592-4596, jul. 2006.

COLWELL, R.R.; GRIEMS, D.J. *Vibrio* diseases of marine fish populations. **Mar. Res.**, New York, v. 37, n. 4, p. 265-287, mar. 1984.

COMISSÃO DA COMUNIDADE EUROPEIA. Comunicação da Comissão ao Conselho e ao parlamento Europeu. **Estratégia de Desenvolvimento Sustentável da Aquicultura Europeia.** Bruxelas, COM 511 final. 2002. 28p.

COSTA, R. A. **Pesquisa de *Vibrio* no cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* no Estado do Ceará.** 2006. 101f. Dissertação. (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais. Instituto de Ciências do Mar) Programa de Pós-graduação stricto sensu em Engenharia de Pesca – Universidade Federal do Ceará, 2006.

DAY, J.; HALL, C.; KEMP, M; YANEZ-ARANCIBIA, A. Estuários – Critérios para uma classificação ambiental. Associação Brasileira de Recursos Hídricos. **Rev. Bras. Recur. Híd.**, Porto Alegre, v. 5, n. 1, p. 25-35, jan/mar. 2000.

DELBIN, C.T.; PATERNIANI, J.E.S. Diagnóstico da qualidade da água de viveiros de peixes destinados a pesca no Estado de São Paulo e sul de Minas Gerais – Resultados preliminares. In: **Anais do I Congresso Sul Americano de Aquicultura, X Simpósio Brasileiro de Aquicultura, V Simpósio Brasileiro sobre Cultivo de Camarões, II Feira de Tecnologia e produtos para Aquicultura**. Recife, 1998. p. 198.

DELGADO, C. L ; WADA, N ; ROSENGRANT, M. W. ; MEIJER, S ; AHMED, M. Outlook for fish to 2020: Meeting global demand. **Food Policy Res. Inst.**, Washington, v. 30, n. 6, p. 17-28, 30 oct. 2003.

DERÍSIO, J.C. **Introdução ao Controle de Poluição Ambiental**. CETESB, São Paulo, 1. ed. 1992. 210p.

DIEGUES, A. C. **Para uma aqüicultura sustentável do Brasil**. Relatório à FAO NUPAUB – Núcleo de apoio à Pesquisa sobre populações Humanas e Áreas Úmidas brasileiras – USP, São Paulo, n. 3. 2006. 26p.

DIGGLES, B.K.; CARSON, J.; HINE, P.M.; HIEKMAN, R.W.; TAIT, M.J. Vibrio species associated with mortalities in hatchery-reared turbot (*Colistium mudipinnis* and brill *C. guntheri*) in New Zealand. **Aquac. Res.**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 1-12, oct. 2000.

DOWNES, M. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington, 4. ed., 2001. p. 676.

DSMZ - Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen. **Identification of microorganisms**. Disponível em: <http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm>. Acesso em: 04 mai. 2010.

DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSEMBERG, E.; SCHEIFER, K. H.; STACKEBRANDT, E. **The Prokaryotes**. A handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology and Biochemistry. 3 ed. 2006. 1185p.

EKENDAHL, S.; ARLINGER, J.; STAHL, F.; PEDERSEN, K. Characterization of attached bacterial populations in deep granitic groundwater from the Stripa research mine by 16S-

rRNA gene sequencing and scanning electron microscopy. **Microbiol.**, Nova York, v. 140, n. 7, p. 1575-1583, 14 jan. 1994.

ELLIOT, E.L.; KAYSNER, C. A.; JACKSON, L.; TAMPLIN, M. L. *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and other *Vibrio spp.* In: FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, **Bacteriological Analytical Manual on line**. FDA/Center for Food Safety and Applied Nutrition – CFSAN. 2001.

EMERENCIANO, M. G. C.; WASIELESKY, W. JR.; SOARES, R. B.; BALLESTER, E. C.; IZEPI, E. M. E.; CAVALLI, R. O. Crescimento e sobrevivência do camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) na fase de berçário em meio heterotrófico. **Aquat. Sci.**, Bethesda, v. 29, n. 1, p. 1-7, abr. 2007.

ESSAM, T.; AMIN, M. A.; TAYEB, O. E.; MATTIASSON, B.; GUIEYSSE, B. Kinetics and metabolic versatility of highly tolerant phenol degrading *Alcaligenes* strain TW1. **J. Hazard. Mater.**, Amsterdam, v. 173, n. 3, p. 783–788, jan. 2010.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Aquaculture production: values 1960-2008. In: **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Aquaculture in China and Asia. Rome, versão 2.5.2000, 1 CD-ROM Media Fact Sheet. May. 2008. 176p.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The definitions of aquaculture and collection of statistics**. FAO Aquaculture. BARG, U.C.- Guidelines for the promotion of environmental management of coastal aquaculture. FAO Fisheries Technical, v. 328, n. 68, aug.1990. 122p.

FERREIRA, C.M. A importância da água e sua utilização em ranários comerciais. Instituto de Pesca/SP. **Panor. Aquic.**, Rio de Janeiro, v. 13, n 79, p. 15-17, set. 2003.

FONSECA, L. V.; MARINS, R. V.; LACERDA, L. D. Caracterização geral da área de mangue do Rio Pacoti (CE) através de medição de parâmetros hidroquímicos, frações de fósforo (T-PO₄, D-PO₄ E PART-PO₄) e total de sólidos em suspensão (TSS). In: **Anais do IV Simpósio Brasileiro de Oceanografia, 2008**. São Paulo: Instituto Oceanográfico USP, 2008. 42p.

FOUZ, B.; TORANZO, A.E.; MARCO-NOALES, E.; AMARO, C. Survival of fish virulent strains of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* in seawater under starvation conditions. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 168, n. 2, p. 181–186, nov. 1998.

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. **Food Microbiology**. New York: Mc Graw - Hill, 1988. 681p.

FUNKEL, G.; CARLOTIL, A. Differentiation of *Brevibacterium* spp. Encountered in Clinical Specimens. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 32, n. 7, p. 1729-1732, jul.1994.

GEFFEN, Y.; ROSENBERG, E. Stress-induced rapid release of antibacterials by scleractinian corals. **Mar. Biol.**, Berlin, v. 146, n. 5, p. 931-935. 2005.

GLUPCZYNSKI, Y. HANSEN, W; FRENEY, J.; YOURASSOWSK, E. In vitro susceptibility of *Alcaligenes denitrificans* subsp. *Xylosoxidans* to 24 antimicrobial agents. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Bethesda, v. 32, n. 2, p. 276-278, feb. 1988.

GONZÁLEZ-FELIX, M. L.; GÓMEZ-JIMENEZ, S.; PEREZ-VELAZQUEZ, M.; DAVIS, D. A.; VELAZCO-RAMEÑOS, J. G. Nitrogen budget for a low salinity, zero-water exchange culture system: I. Effect of dietary protein level on the performance of *Litopenaeus vannamei* (Boone). **Aquac. Res.**, Oxford, v. 38, n. 8, p.798-808, jun. 2007.

GUTIERREZ-WING, M.T.; MALONE, R.F. Biological filters in aquaculture: trends and research directions for freshwater and marine applications. **Aquac. Eng.**, Essex, v.34, n.3, p.163-171., may. 2006.

HALDEMAN, D. L.; AMY, P. S.; RINGELBERG, D.; WHITE, D. C. Characterization of the microbiology within a 21 section of rock from the deep subsurface. **FEMS microbiol. ecol.**, Amsterdam, v.34, n.26, p. 145-159, jun. 1993.

HENRY-SILVA, G.G. **Utilização de macrófitas aquáticas flutuantes (*Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Salvinia molesta*) no tratamento de efluentes de piscicultura e possibilidades de aproveitamento da biomassa vegetal**. 2001. 79f. Dissertação (Mestrado em aquicultura de águas continentais), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2001.

HOVANEC, T. A.; DELONG, E. F. Comparative Analysis of Nitrifying Bacteria Associated with Freshwater and Marine Aquaria. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 62, n. 8, p. 2888–2896, aug. 1996.

HOWGATE, P. Review of public health safety of products from aquaculture. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, Abingdon, v. 33, n. 2, p. 99-125, apr. 1998.

HUANG, C. H. Aquaculture and the endogenous damage cost of water pollution: the case of Taiwan. **Aquacult. Econ. Manag.**, Oxford, v. 1, n.1, p. 99–108, march.1997.

HUMPHREY, J. D.; L. D. ASHBURNER. Spread of the bacterial fish pathogen *Aeromonas salmonicida* after importation of infected goldfish, *Carrasius auratus*, into Australia. **Aust. Vet. J.**, Brunswick, v. 70, n. 12, p. 453 – 454, dec. 1993.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais. **Estatística da Pesca – Ano de 2007**. Disponível em: www.ibama.gov.br/recursospesqueiros. Acesso em: 16 mar. 2010.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais. **Estatística da Pesca – Ano de 2004**. Disponível em: www.ibama.gov.br/recursospesqueiros. Acesso em: 16 mar. 2010.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais. **Estatística da Pesca – Ano de 2003**. Disponível em: www.ibama.gov.br/recursospesqueiros. Acesso em: 16 mar. 2010.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Dados estatísticos do Brasil 2001**. Disponível em: www1.ibge.gov.br/ibge/estatistica/população. Acesso em: 16 mar. 2010.

JETTEN, M. S. M. **Novel principles in the Microbial conversion of nitrogen compounds**. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. Antonie van Leeuwenhoek, 1997. p. 75-93.

JOSUPEIT, H. Future demand of fish and impact on trade. Globefish. **Fish Utilization and Marketing Service 2004**. Fisheries Department, FAO, Rome. Disponível em: http://www.globefish.org/files/consumptionprojections2_184.pdf. Acesso em: 05 mar. 2010.

JUN, L.; JUN, Y.; FOO, R.; JULIA, L.; HUAISHU, X.; NORMAN, Y. Antibiotic resistance and plasmid profiles of *Vibrio* isolates from cultured silver sea bream, *Sparus sarba*. **Mar. Pollut. Bull.**, Oxford, v. 39, n. 12, p. 45-49. 2003.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. D.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. **Diagnóstico microbiológico**. Rio de Janeiro, 5. ed. 2001. 1465p.

KONEMAN, E.; ALLEN, S.; JANDA, W.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERG, P.; WOOD, G. **Color Atlas and textbook of Diagnostic microbiology**. Washington, 6. ed. 2006. 1535p.

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

LELLIOTT, R.A.; STEAD, D. E. Methods for the Diagnosis of bacterial plant disease. **Aquac. Res.**, Oxford, v.2, n.1, p. 216, apr. 1987.

LESORDO, T. M.; MASSER, M. P.; RAKOCY, J. **Recirculating Aquaculture Tank Production Systems**. SRAC Publication, n. 451. 1998. 6p.

LI, J.; YIE, J.; FOO, R.W.T.; LING, J.M.L.; XU, H.; WOO, N.Y.S. Antibiotic Resistance and Plasmid Profiles of *Vibrio* Isolates from Cultured Silver Sea Bream, *Sparus sarba*. **Mar. Pollut. Bull.**, Oxford, v. 39, n. 1-12, p. 245-249, jan. 1999.

LIMA, F. T.; TAVARES, L. H. S. **Uso de “wetland” construído para tratamento de águas residuárias de aquicultura**. Centro de aquicultura, UNESP. 2008. 15p.

LIVERMORE, D. M. Bacterial Resistance: Origins, Epidemiology, and Impact. **Clinical Infectious Diseases**. 2003. p.11-23

LUDWING, W.; MITTENHUBER, G.; FRIEDRICH, C. G. Transfer of Thiosphaera pantotropha to *Paracoccus denitrificans*. **Int. j. syst. evol. microbiol**, Reading, v. 43, n. 2, p. 363-367, apr. 1993.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J. B. **Biology of microorganisms**. Editora Pearson Education, 11. ed. 2006. 357p.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, M J.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. Editora Pearson Education, 10. ed. 2004. 196p.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. B. **Biology of microorganisms**. Prentice Hall International, Estados Unidos, 9. ed. 2000. 991p.

MAGARINOS, B.; COUSO, N.; NOYA, M.; MERINO, P.; TORANZO, A. E.; LAMAS, J. Effect of temperature on the development of pasteurellosis in carrier gilthead seabream (*Sparus auratus*). **Aquac. Res.**, Oxford, v. 195, n. 6, p. 17-21, apr. 2001.

MAHON, C. R.; MANUSELIS, G. Text book of Diagnostic Microbiology. W.B. Saunders Company a division of Harcourt Brace & company. In: **Anais do Library of Congress cataloging-in-publication data**. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney and Tokyo, 1995, Printed in the United States of American. 1995. 1134p.

MANJUSHA S.; SARITA G. B.; ELYAS K. K.; CHANDRASEKARAN M. Multiple Antibiotic Resistances of Vibrio Isolates from Coastal and Brackish Water Areas. **Am. J. Biochem. Biotech.**, Oxford, v. 1, n. 4, p. 201-206. 2005.

MANTILLA, S. P. S.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T. O.; SANTOS, E. B.; GOUVÊA, R. Resistência antimicrobiana de bactérias do gênero *Listeria spp.* isoladas de carne moída bovina. Universidade Federal Fluminense, Niterói-RJ. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 45, n. 2, p. 116-121, dez. 2008.

MATSUZAKA, E.; NOMURA, N.; NAKA, J. K. T.; OKADA, N.; NAKAHARA, T. A. Simple Screening procedure for heterotrophic nitrifying bacteria with oxygen-tolerant denitrification activity. **J. Biosci. Bioeng.**, Osaka, v. 95, n.4, p. 409-411, aug. 2003.

MAXIMIANO, A. A.; FERNANDES, R. O.; NUNES, F. P.; ASSIS, M. P.; MATOS, R. V.; BARBOSA, C. G. S.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Utilização de drogas veterinárias, agrotóxicos e afins em ambientes hídricos: demandas, regulamentação e considerações sobre riscos à saúde humana e ambiental. **Rev. Cienc. Saude.**, Brasília, n. 2, p. 483-491, apr./june. 2005.

MAY, S. **Caracterização, tratamento e reuso de águas cinzas e aproveitamento de águas pluviais em edificações**. Rede de Universidades, red oportunidades. 2009. Disponível em: www.biblioteca.universia.net. Acesso em: 16 abr. 2010.

MCDUGALD, D.; KJELLEBERG, S. Adaptive responses of Vibrio. In: THOMPSON, F. L.; AUSTIN, B.; SWINGS, J. **The Biology of Vibrios**. Washington, 2006. p. 133-155.

MELO, J.S.C. **Água e Construção de Viveiros na Piscicultura**. 1999. p. 102.

MELO, M.T.D.; SAKER-SAMPAIO, S.; VIEIRA, R.S.H.F. **Avaliação da poluição orgânica no estuário do Rio Ceará (Fortaleza - Ceará - Brasil)**. Caatinga, v. 7, 1990. p. 207 – 219.

MENEZES, C. H. P.; NEUFELD, P. M. **Bacteriologia e Micologia para o Laboratório Clínico**. Editora Revinter. 2006. 497p.

MENEZES, F. G. R. **Diversidade de *Vibrio* spp. em estuários no Estado do Ceará associada à atividade de carcinicultura**. 98f. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) Programa de Pós-graduação stricto sensu em Ciências Marinhas Tropicais – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2005.

METCALF; EDDY. **Wasterwater Engineering: Treatment, Disposal, Reuse**. Nova York, 3. ed., 1991. p. 1.334.

MICHAUD, L.; BLANCHETON, J.P.; BRUNI, V.; PIEDRAHITA, R. Effect of particulate organic carbon on heterotrophic bacterial populations and nitrification efficiency in biological filters. **Aquac. Eng.**, Essex, v. 34, n.3, p. 224–233, may. 2006.

MIDLEN, A.; REDDING, T. **Environmental Management for Aquaculture**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 1998. 223p.

MILLER C. L. **The effects of dietary protein and lipid on growth and body composition of juvenile red snapper, *Lutjanus campechanus*** (Poey, 1860). Theses for obtention title the Master of Science, Department of Fisheries and Allied Aquaculture, Auburn University, Auburn, Alabama, United States of América. 2003. 69p.

MOLINA-AJA, A.; GARCÍA-GASCA, A.; ABREU-GROBOIS, A.; BOLÁN-MEJÍA, C.; ROQUE, A.; GOMEZ-GIL, B. Plasmid profiling and antibiotic resistance of *Vibrio* strains isolated from cultured penaeid shrimp. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 213, n. 1, p. 1-139, jul. 2002.

MORIARTY, D. J. W.; COOK, H. L.; BIN HASSAN, R.; THANABAL, M. **Primary production and meio fauna number in some penaeid prawn aquaculture ponds at Gelang Patah**. Malaysian, p. 37-51. 1983.

MORIARTY; D.J.W. The role of microorganisms in aquaculture ponds. **Aquac.** Amsterdam, v. 151, n. 1, p. 333-349, may. 1997.

MUNN, C.B.; MARCHANT, H. K.; MOODY, A.J. Defences against oxidative stress in *Vibrios* associated with corals. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 281, n. 1, p. 58-63, apr. 2008.

MURRAY, P. R.; BARON, ELLEN, J. B.; FALLER, M. A. P.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. American Society for Microbiology ASM PRESS Washington, D.C. Library of Congress Cataloging-in-Publication, 7. ed.. 2005. 1773p.

NASCIMENTO, S. M. M.; VIEIRA, R. H. S. F.; THEOPHILO, G. N. D.; RODRIGUES, D. P. ; VIEIRA, G. H. F. *Vibrio vulnificus* as a health hazard for shrimp consumers. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 263-266, sep./oct. 2001.

NEDER, K. D., QUEIROZ, T.R., SOUZA, M.A.A. Remoção de Sólidos Suspensos de Efluentes de Lagoas de Estabilização por meio de Processos Naturais. In: **Anais do XXVII – Congresso Internacional de Engenharia Sanitária e Ambiental**. ABES – Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, Brasília. 2000.

NISHIGUCHI, M. K.; JONES, B. W. **Origins, Evolution, and the Biodiversity of Microbial Life**. United States, Edited by Joseph Seckbach, Kluwer Academic Publishers, 2004. 535p.

NOGUEROLA, I.; BLANCH, A.R. Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomous Keys. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 105, n. 1, p. 175-185, July. 2008.

OLIVEIRA, C. G. **Regulação gênica da biossíntese de Violaceína e Quorum sensing em *Chromobacterium violaceum***. 2005. 159 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina. 2005.

OLIVEIRA, J. M.; DUARTE, A. L.; PEREIRA, T. G.; BRANCO, M. A.C.; RAMOS, P.; RUANO, F.; SOBRAL, M. P. **Uma possível alternativa para a aquicultura marinha tradicional**. IPIMAR - Instituto de investigação das pesca e do mar, Brasília, n. 27, Jan. 2003. 4p.

ONO, E. A. **Cultivo de peixes em tanques-rede**. Rio de Janeiro: Fundação Biblioteca Nacional, 1998. p. 41

OPLUSTIL, C. P.; ZOCCOLI, C. M.; TOBOUTI, N. R.; SINTO, S. I. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. São Paulo, 2. ed., Editora Sarvier. 2004. 232p.

OTTAVIANI, D.; BACCHIOCCHI, I.; MASINI, L.; LEONI, F.; CARRATURO, A.; GIAMMARIOLI, M.; SBARAGLIA, G. Antimicrobial susceptibility of potentially pathogenic halophilic vibrios isolated from seafood. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, Amsterdam, v. 18, n. 18, p. 135–140, August. 2001.

OZER, S.; ASLAN, G.; TEZCAN, S.; BULDUKLU, P.S.; SERIN, M.S.; EMEKDAS, G. Genetic Heterogeneity and Antibiotic Susceptibility of *Vibrio alginolyticus* Strains Isolated from Horse-Mackerel (*Trachurus trachurus* L., 1758). **J. Vet. Anim. Sci.**, Kerala, v. 32, n. 2, p. 107-112, mar. 2008.

PÁEZ-OSUNA, F.; GUERRERO-GALVAN, S.R.; RUIZ-FERNANDEZ, A.C.; ESPINOZA-ANGULO, R. Fluxes and mass balance of nutrients in a semi-intensive shrimp farm in northwestern Mexico. **Mar. Pollut. Bull.**, Oxford, v. 34, n. 5, p. 290–297, may.1997.

PAL, D.; DASGUPTA, C. Microbial pollution in water and its effect on fish. **J. Aquat. Anim. Health.**, Bethesda, v. 4, n. 1, p. 32–39, jan. 1992.

PHILLIPS, M. J.; BEVERIDGE, M. C. M.; CLARK, R. M. Impact of Aquaculture on Water Resources. In: Rune, D. E.; Tomasso, J. R. (Editors) **Aquaculture and Water Quality**.1991. p. 568-591.

PHILLIPS, M.J.; MACINTOSH, D.J. 1997. Aquaculture and the environment: challenges and opportunities. In: Nambiar, K.P.P.; Singh, T., (Eds.). **Sustainable aquaculture. Proceedings of the INFOFISH-AQUATECH '96 International Conference on aquaculture**. Kuala Lumpur, Malaysia, 25-27, sept. 1996. Kuala Lumpur, INFOFISH, p. 159-170.

PIEDRAHITA, R. H. Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. Department of Biological and Agricultural Engineering, University of California, One Shields Avenue, Davis, CA 95616-5294, USA. **Aquac. Res.**, Oxford, v. 226, n. 4, p. 35–44, oct. 2003.

PILLARY, T. V. R., 1992. **Aquaculture and environment**. Fishing News Books, Blackwell Science Ltda, Oxford. 1992.189p.

PIMENTA, H. C. D.; TORRES, F. R. M.; RODRIGUES, B. S.; ROCHA, J.M. O esgoto: a importância do tratamento e as opções tecnológicas. In: Encontro Nacional de Engenharia de Produção, 2002. In: **Anais do XXII Encontro Nacional de Engenharia de Produção**. Curitiba, 2002. p.1-11.

POLI, C.R.; POLI, A.T.; ANDREATTA, E.; BELTRAME, E. **Aqüicultura experiências brasileiras**. Multitarefa Editora Ltda. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2004. 455p.

PROENÇA, C. E. M; BITTENCOURT, P. R. L. **Manual de Piscicultura Tropical**. Brasília: IBAMA, DIREN, DEPAQ/DIPEA, 1994. 196p.

QUEIROZ, A. B. J. **A análise ambiental do estado de conservação do baixo curso do Rio Pacoti-Ceará.** 2005. 123 f. Dissertação (Mestrado em desenvolvimento e meio ambiente), Núcleo de Pós-Graduação e Estudos do Semi-Árido, Fortaleza. 2005.

RADUS S.; YUHERMAN J.; YEANG L.; NISHIBUCHI M. Detection and molecular characterization of *Vibrio vulnificus* from coastal waters of Malaysia. **J. Trop. Med. Pub.**, South East Asian, v. 31, n. 2, p. 668-673, dec. 2000.

RAMAIAH, N.; HILL, R. T.; CHUN, J.; RAVEL, J.; MATTE, M. H.; STRAUBE, W. L.; COLWELL, R. R. Use of a probe for detection of chitinase genes in bacteria from the Chesapeake Bay. **FEMS Microbiol. Ecol.**, Amsterdam, v.34, n. 1, p. 63-71, oct. 2000.

RASOAMANANJARA, D.; KOROSK, B.; MONTEIL, H. Classification and Identification of *Flavobacterium* Species by Carbon Source Utilization. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 25, n. 7, p. 1285-1290, jul. 1987.

RAVICHANDRAN, R.; SHAICK J. R.; JALALUDDIN, R. **Estresse estratégia de gestão com probióticos para a prevenção de doenças em camarão.** *Pescas e Aquicultura*, 2001. p. 73-74.

REBOUÇAS, H. R. **Perfil de resistência a antimicrobianos de vibrio isolado de água de viveiro e de camarão (*Litopenaeus vannamei*) cultivado em fazendas no Estado do Ceará.** 2008. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) Programa de Pós-graduação stricto sensu em Ciências Marinhas Tropicais – Unversidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2008.

REHFUSS, M.; URBAN, J. *Alcaligenes faecalis subsp. Phenolicus subsp. nov.* a phenol-degrading, denitrifying bacterium isolated from a graywater bioprocessor. **Syst. Appl. Microbiol.**, Stuttgart, v. 25, n. 5, p. 421–429, jul. 2005.

RHODES, G.; HUYS, G.; SWINGS, J.; MACGANN, P.; HINEY, M.; SMITH, P.; PICKUP, R. Distribution of oxytetracycline plasmids between *Aeromonads* in hospital and aquaculture environments: implications of Tn 1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 66, n. 9, p. 3883-3890, sept. 2000.

RITTMANN, B. E.; LANGELAND, W. E. **Simultaneous denitrification with nitrification in single channel.** In: RIVAS, L. R. Systematic review of the perciform fishes of the genus *Centropomus*, 1986. p. 579-611.

ROBERTS, H. E.; PALMEIRO, B.; WEBER, S. **Bacterial and Parasitic Diseases of Pet Fish**. Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice, 2009. p. 609–638.

ROCHA, I. P.; ROCHA, D. M. **Panorama da produção mundial e brasileira de pescados, com ênfase para o seguimento da aquicultura**. 2010. Disponível em: www.abccam.com.br/download/PanoramaAquiculturaFevereiro2010.pdf. Acesso em: 17 de abril de 2010.

ROCHA, R. S. **Vibrio spp. na água e sedimento de viveiros de fazenda de carcinicultura no Estado do Ceará – Brasil**. 2008. 33 f. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará. 2008.

RUSTEN, B.; LARS, J. H.; ODEGAARD, H. Nitrification of Municipal wastewater in cold climate using moving bed reactors. **Water Environ. Res.**, Alexandria, v. 67, n.1, p. 75-86, jan./feb.1995.

SAAVEDRA, M. J.; BRITO, R. D.; SOUSA, M.; ALVES, A.; REMA, P. Isolamento de *Pasteurella spp.* e *Vibrio spp.* em robalos (*Dicentrarchus labrax*). Susceptibilidade a diferentes grupos de antibióticos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 56, n. 2, p. 277-279, abr. 2004.

SAMPAIO, L. A. Reprodução e larvicultura do peixe-rei marinho. **Panor. Aquic.**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 59, p. 15-18, mai./jun. 2000.

SAMUELSEN, O. B.; NERLAND, A. H.; JØRGENSEN, T.; SCHRØDER, M. B.; SVÅSAND, T.; BERGH, Ø. Viral and bacterial diseases of Atlantic cod *Gadus morhua*, their prophylaxis and treatment: a review. **Dis. Aquat. Org.**, Oldendorf, v. 71, n. 3, p. 239–254, aug. 2006.

SARTER, S.; NGUYEN, H. N.K.; HUNG, L.T.; LAZARD, J.; MONTET, D. Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria isolated from farmed catfish. **Food Control.**, Guildford, v.18, n. 11, p. 1391-1396, nov. 2007.

SCHETTINI, C. A. F. Caracterização física do Estuário do Rio Itajai-Açu-SC. **Rev. Bras. Recur. Hidr.**, Porto Alegre, v. 7, n.1, p. 123-142, jan./mar. 2002.

SCHMIDT, A. S.; MORTEN, S. B.; DALSGAARD, K. P. Occurrence of antimicrobial resistance in fish pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 66, n. 11, p. 4908-4915, nov. 2000.

SCHMIDT, E.L.; BELSER, L.W. **Nitrifying Bacteria**. In: Methods of Soil Analysis – Chemical and Microbiological Properties. Wisconsin, 2. ed., n. 9, part 2, 1984. p. 1027 – 1042.

SCHROLL, G.; BUSSE, H.-J.; PARRER, G.; ROE LLEKE, S.; LUBITZ, W.; DENNER, E. B. M. *Alcaligenes faecalis* subsp. *parafaecalis* subsp. nov. a bacterium accumulating poly-beta-hydroxybutyrate from acetonebutanol bioprocess residues. **Syst. Appl. Microbiol.**, Stuttgart, v. 24, n.1, p. 37–43, apr. 2001.

SEDLAK, R. **Phosphorus and nitrogen removal from Municipal wastewater: Principles and Practice**. 2 ed., Lewis Publishers, Estado Unidos. 1991. 240p.

SHAFAI EL, S.A.; GIJZEN, H.J.; NASR, F.A.; EL-GOHARY, F.A. Microbial quality of tilapia reared in fecal contaminated ponds. **Environ. Res.**, San Diego, v. 95, n.2, p. 231-238, jun. 2004.

SHIVAJI, S.; RAO, N.S; SHETH, V.; REDDY, G. S. N.; BHARGAVA, P.M. Isolation and identification of *Micrococcus roseus* and *Panococcus* sp. From Shirmacher oasis, Antarctica. **J. Biosci.**, Bangalore, v.13, n. 4, p. 409-414, dec. 1988.

SIEBERT, J.; HIRSCH, P. Characterization of 15 selected coccal bacteria isolated from Antarctic rock and soil samples from the McMurdo valley (South Victoria land). **Polar Biol.**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 37-44, oct. 1988.

SILVA, A. L. N.; SOUZA, R. A. L. **Glossário de aquicultura**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 1998. 97p.

SILVA, E. N. **Tecnologia avançada de carnes e derivados contaminação e deterioração da carne**. Universidade Estadual de Campinas Faculdade de Engenharia de Alimentos Departamento de Tecnologia de Alimentos – UNICAMP. 1999. p. 55-63.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de Métodos de Análises Microbiológica de Alimentos**. Livraria: Varela LTDA, 2. Ed., Editora Loyola, São Paulo. 1997. 317p.

SILVERT, W. Assessing environmental impact of finfish aquaculture in marine waters. **Aquac. Res.**, Oxford, v. 107, n. 1, p. 67-79, oct. 1992.

SIMIDU, U.; KANEKO, E.; TAGA, N. Microbiological studies of Tokyo Bay. **FEMS Microbiol. Ecol.**, Amsterdam, v. 3, n. 3, p. 173-191, sep. 1977.

SMITH, S. D. A. The effects of domestic sewage effluent on marine communities at Coff's harbour, New South Wales, Australia. **Mar. Pollut. Bull.**, Oxford, v. 33, n. 12, p. 309-316, jun. 1996.

SØRUM, H. **Antimicrobial drug resistance in fish pathogens**. In: Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin. Aarestrup, F.M. edition. Washington, DC, USA: American Society for Microbiology Press, cap. 13, 2006. p. 213–238.

SOUSA, J. T.; FORESTI, E. Utilização de lodo anaeróbio como fonte externa de carbono no processo de desnitrificação de águas residuárias. **GESTÃO E CONTROLE AMBIENTAL. Ver. Bras. Eng. Agri. Amb.**, Campina Grande, v.3, n.1, p. 69-73, jan./abr. 1999

SOUSA, O. V. **Avaliação do perfil da comunidade microbiana de ecossistemas de manguezal receptores de efluentes da atividade de cultivo de camarão no Estado do Ceará, Brasil**. 2006. 102 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Microbiologia) Programa de Pós-graduação stricto sensu em Ciências Biológicas – Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2006.

STALEY, J. T.; BOONE, D. R.; BRENNER, D. J.; VOS, P. D.; GARRITY, G. M.; GOODFELLOW, M.; KRIEG, N. R.; RAINEY, F. A.; SCHLEIFER, K. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2 ed., v. 2. The Proteobacteria part. B. The Alpha-, Beta-, Delta- and Epsilonproteobacteria. 2005. 1388p.

SURMACZ-GÓRSKA, J.; CICHON, A.; MIKSCH, K. Nitrogen removal from wastewater with high ammonia nitrogen concentration via shorter nitrification and denitrification. **Water Sci. Technol.**, London, v. 36, n. 10, p. 73-78, jun.1997.

TELLES, D. A. Água na Agricultura e Pecuária. In: REBOUÇAS, A. da C.; BRAGA, B.; TUNDISI, J.G. (Orgs.). **Águas Doces no Brasil: Capital Ecológico, Uso e Conservação**. São Paulo: Escrituras Edição e Distribuição de Livros Ltda, 2002. p. 305-337.

TENDENCIA, E. A.; PEÑA, L. D. Level and percentage recovery of resistance to oxytetracycline and oxolic acid of bacteria from shrimp ponds. **Aquac.**, Amsterdam, v. 213, n.4, p. 1-13, oct. 2002.

TEUBER, M. Veterinary use and antibiotic resistance. **Curr. Opin. Microbiol.**, Oxford, v. 4, n.5, p. 493-499, oct. 2001.

THOMPSON, C. C.; THOMPSON, F. L.; VICENTE, A. C. P.; SWINGS, J. Phylogenetic analysis of vibrios and related species by means of atpA gene sequences. **Int. J. System. Evolution. Microbiol.**, Reading, v. 57, n.11, p.2480-2484, nov. 2007.

THOMPSON, F.L.; ABREU, P. C.; WASIELESKY JR., W. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. **Aquac. Res.**, Oxford, v. 203, n. 4, p. 263-278, jan. 2002.

TIEDJE, J. **Denitrification**. In: Methods of Soil Analysis - Chemical and Microbiological Properties. Wisconsin, 2 ed., n. 9, Part 2, 1984. p. 1011-1026.

TROWER, C. J.; ABO, S.; MAJEED, K.N.; VON ITZSTEIN, M. Production of an enterotoxin by a gastroenteritis associated Aeromonas strains. **Int. J. Med. Microbiol.**, Jena, v.49, n. 2, p.121-126, feb. 2000.

URAKAWA, H.; RIVERA, I. N. G. Aquatic Environment. In: THOMPSON, F. L.; AUSTIN, B.; SWINGS, J. **The Biology of Vibrios**. Washington, D.C: ASM Press, 2006. p. 175-189.

VALENTI, W. C.; POLI, C. R.; PEREIRA, J. A.; BORGHETTI, J. R. **Aqüicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável**. Brasília: CNPq, 2000. 399p.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, New York, v. 64, n. 4, p. 655-671, dec. 2000.

VIEIRA, R. H. S. F.; TÔRRES, R. C. O. **Estimativa da população de coliformes totais, termotolerantes e Escherichia coli através do número mais provável (NMP)**. In: VIEIRA, R. H. S. F. Microbiologia, higiene e qualidade do pescado. São Paulo, Editora Varela. 2004. p. 219-226.

VON BAUM, H.; MARRE, R. Antimicrobial resistência of Escherichia coli and therapeutic implications. **Int. J. Med. Microbiol.**, Jena, v. 295, n.7, p. 503-511, oct. 2005.

XUEA, X., HONGA, H., CHARLESB, A.T. Cumulative environmental impacts and integrated coastal management: the case of Xiamen, China. **J. Environ. Manag.**, London, v.71, n.3, p. 271–283, jul. 2004.

YANLING, W. P. C.; LEUNG, P.; PEI-YUAN, Q.; JI-DONG, G. Antibiotic resistance and plasmid profile of environmental isolates of *Vibrio* species from Mai Po Nature Reserve, Hong Kong. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, New York, v. 15, n. 4, p. 371–378, may. 2006