



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Caracterização da microbiota bacteriana associada ao muco da pele de corvinas (*Argyrosomus regius*) produzidas em diferentes sistemas multitróficos integrados (IMTA)**

Eunice Graça Venâncio Cassoma

Dissertação apresentada para obtenção do grau de mestre em Aquaculturas e Pescas  
Especialização em Aquacultura

Faro, 2017



Universidade do Algarve  
Faculdade de Ciências e Tecnologia  
Mestrado em Aquacultura e Pescas

**Caracterização da microbiota bacteriana associada ao muco da pele de corvinas (*Argyrosomus regius*) produzidas em diferentes sistemas multitróficos integrados (IMTA)**

Eunice Graça Venâncio Cassoma

Dissertação apresentada para obtenção do grau de mestre em Aquaculturas e Pescas  
Especialização em Aquacultura

**Orientadora:** Doutora Florbela Soares (Instituto Português do Mar e Atmosfera (IPMA), Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO)).

**Coorientadora:** Professora Doutora Elsa Cabrita (Universidade do Algarve, Faculdade de Ciências e Tecnologia)

Faro, 2017



## **Declaração de autoria de trabalho**

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

A autora:

---

Eunice Graça Venâncio Cassoma

### **Direitos de cópia ou Copyright**

© **Copyright:** Eunice Graça Venâncio Cassoma

*A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.*

***“Viva com a certeza de que tudo vai terminar bem “***

*(Ellen G. White)*

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos grandes heróis da minha vida,  
“meu pai e minha mãe”.*

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar agradeço a Deus todo-poderoso, pela vida, saúde, força, motivação, certeza e paz que não estava só nesta luta;

À Estação Piloto de Piscicultura de Olhão - EPPO (IPMA), em particular o Doutor Pedro Pousão por me ter permitido fazer o estágio neste lugar fantástico e acolhedor, com um excelente grau científico e profissional;

À Dr.<sup>a</sup> Florbela Soares por ter aceitado orientar-me nesta tese, o meu muito obrigado pela ajuda, pelas ideias, pela disponibilidade e paciência;

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elsa Cabrita pela coorientação, disponibilidade e carinho que sempre demonstrou, pelas críticas, sugestões e ajuda durante todo o meu período de formação;

À todo o pessoal da EPPO, em especial o Márcio Moreira pelo apoio, disponibilidade, paciência e pelos conhecimentos partilhados durante a realização deste trabalho, ao Hugo pela sua atenção e disponibilidade, aos senhores Nuno e João pela alegria e amizade;

Ao Ministério das Pescas da República de Angola e ao Instituto Nacional de Investigação Pesqueira de Angola (INIP) pela contemplação da bolsa de estudo, em particular aos Doutores Assis, Filomena Vaz Velho, Joana Lopes e Antónia Ombanza.

Aos meus queridos Pais, “Vicente Cassoma e Celina Cassoma” o meu profundo agradecimento pelo amor, carinho, e pelo apoio incondicional na minha formação como pessoa e académica, e os meus seis orgulhos “meus maninhos” Victor, Henrique, Nelito, Venâncio, Aguinaldo e Reginaldo e toda minha família em geral;

Ao meu querido Zola Pires e a sua família, pelo apoio incondicional, paciência, amor e confiança;

Aos meus irmãos e companheiros de luta do “Bloco 6B 8ºesquerdo” Canga, Emmanuel, Miriam, Panguila e Suzana, sem esquecer os primos Nelson e Domingas, pelo apoio,

suporte, companheirismo, muito obrigado de coração por tudo, que possamos continuar sempre unidos, sem esquecer o nosso irmão de Cabo Verde Victor Mendes;

Aos meus colegas de curso, em especial a Ana Catarina, Filipa, Sónia, Renata e João Cruz;

À Paula Caboz e o pessoal do Gabinete de Relações Internacionais e Mobilidade - GRIM, pela amizade, e disponibilidade;

À todos que directa ou indirectamente contribuíram para realização deste trabalho.

## RESUMO

Atualmente, têm vindo a ser observados inúmeros problemas ligados à sustentabilidade em aquacultura convencional, devido à acumulação de nutrientes orgânicos, derivados do resto de ração não consumida e produtos de excreção, resultantes dos organismos produzidos nos sistemas de cultivo. Como alternativa, nos últimos anos, vem-se prestando uma maior atenção à Aquacultura Multitrófica Integrada (Integrated Multitrophic Aquaculture – IMTA), que é um sistema de cultivo que permite um aproveitamento de forma sustentável da energia e matéria, através da reciclagem dos nutrientes, possibilitando um manuseamento equilibrado do ambiente, o que se refletirá na qualidade da água e no bem-estar dos peixes cultivados. Com o presente trabalho pretende-se caracterizar a microbiota bacteriana associada ao muco da pele de corvinas (*Argyrosomus regius*) produzidas em diferentes sistemas IMTA. Para este efeito foram efectuadas amostragens mensais, durante os meses de maio a novembro de 2016. Diariamente em cada tanque foram determinados os parâmetros físico-químicos da água, nomeadamente o pH, a temperatura, oxigénio dissolvido, salinidade e turbidez. Em cada amostragem foram recolhidas 6 corvinas de cada tanque, divididos em três sistemas de cultivo IMTA com dois replicados (IMTA 1: Peixe + Ostras + Macroalgas, IMTA 2: Peixes + Ostras, e IMTA 3: Peixes + Macroalgas) para a recolha dos dados biométricos (comprimento e peso) e bacteriológicos (muco). Os resultados permitiram observar que os parâmetros físico – químicos influenciaram fortemente na variação dos parâmetros microbiológicos, (teor de bactérias marinhas totais, *Vibrionaceae* e *Pseudomonas*), rondando o número de bactérias marinhas totais, no muco da pele das corvinas entre  $10^3$ - $10^5$  cfu. g<sup>-1</sup>. Os géneros identificados no muco da pele das corvinas produzidas nos três sistemas - IMTA foram *Vibrio* spp., *Pseudomonas* spp., *Flavobacterium* spp. e *Aeromonas* spp.

Concluiu-se assim, que o sistema de cultivo IMTA 2, comparativamente aos outros sistemas, foi o que exibiu os valores mais baixos de colonização bacteriana no muco, fator que pode estar associada a alta capacidade de filtração das ostras presentes.

**Palavras-chave:** Aquacultura, sistemas integrados, peixes marinhos, bactérias, muco de peixes.

## ABSTRACT

Currently, there are many problems related to sustainability in conventional aquaculture due to the accumulation of organic nutrients derived from the rest of the non-consumed feed and excretion products resulting from the organisms produced in the cultivation systems. As an alternative, more attention has been paid in recent years to Integrated Multitrophic Aquaculture (IMTA), which is a cultivation system that allows a sustainable use of energy and matter through the recycling of nutrients, reflecting in a better water quality and well-being of farmed fish. This work intends to characterize the bacterial microbiota associated with meagre skin mucus (*Argyrosomus regius*) produced in different IMTA systems. For this purpose monthly sampling were carried out during the months of May to November 2016. Each day, (pH), dissolved oxygen (ppm), salinity (psu) and turbidity were determined. In each sampling, 6 meagre were collected from each tank, divided into three IMTA culture systems with two replicates (IMTA 1: Fish + Oysters + Macroalgae, IMTA 2: Fish + Oysters, and IMTA 3: Fish + Macroalgae) to collect biometric data (length and weight) and bacteriological (mucus). The results allowed to observe that the physicochemical parameters strongly influenced the variation of the microbiological parameters (total marine bacteria content, *Vibrionaceae* and *Pseudomonas*), being the number of total marine bacteria in the skin mucus of the meagre around  $10^3$ - $10^5$  cfu. g<sup>-1</sup>. The genera identified in the skin mucus of the meagre produced in the three treatments were *Vibrio* spp., *Pseudomonas* spp., *Flavobacterium* spp. and *Aeromonas* spp.

It was concluded that the IMTA 2 culture system, compared to other systems, showed the lowest values of bacterial colonization in the mucus, a factor that may be associated with the high filtration capacity of the oysters present in this system.

**Keywords:** Aquaculture, integrated systems, marine fish, bacteria, fish mucus.

# ÍNDICE

<b>DEDICATÓRIA .....</b>	<b>VI</b>
<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>VII</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>X</b>
<b>ÍNDICE.....</b>	<b>XI</b>
<b>INDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>XV</b>
<b>1.INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Aquacultura Multitrófica Integrada .....	2
1.1.2. Comunidade bacteriana da pele dos peixes .....	3
1.1.2.1. Importância da microbiota da pele do peixe .....	5
1.2. OBJETIVO GERAL .....	8
1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	8
<b>2. METODOLOGIA.....</b>	<b>9</b>
2.1. Caracterização da área de estudo .....	9
2.1.1. Desenho experimental .....	10
2.1.2. Amostragem de parâmetros físico-químicos da água .....	11
2.1.3. Amostragem biológica .....	11
2.1.3.1. Preparação dos meios de culturas.....	11
2.1.3.2. Cultivo, isolamento e seleção das bactérias .....	12
2.1.3.3. Identificação bioquímica das bactérias .....	13
2.2. Seleção de Gram (método de Levi).....	13
2.2.1. Teste de catalase.....	13
2.2.2. Teste de oxidase .....	14
2.2.3. Prova de utilização da amílase .....	14
2.2.4. Forma / Mobilidade.....	14
2.3. Análises estatísticas.....	18

<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>19</b>
3.1. Parâmetros físico-químicos da água.....	19
3.2. Parâmetros microbiológicos .....	20
3.2.1. Teor de bactérias marinhas totais .....	20
3.2.2. Teor de <i>Vibrionaceae</i> .....	21
3.2.3. Teor de <i>Pseudomonas</i> spp.....	21
3.3. Relação entre os parâmetros microbiológicos, parâmetros físico-químicos da água e índice de condição. ....	22
3.4. Caracterização da comunidade bacteriana .....	28
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>30</b>
4.1. Parâmetros físico-químicos.....	30
4.2. Parâmetros microbiológicos .....	33
4.3. Relação entre os parâmetros microbiológicos, parâmetros físico-químicos da água e índice de condição (IC) .....	34
4.4. Caracterização da comunidade bacteriana .....	36
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>39</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>52</b>
Anexo : Preparação dos meios de cultura .....	52

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Representação esquemática do funcionamento do sistema IMTA (Adaptado de Chopin, 2006).	2
<b>Figura 2-</b> Descrição esquemática do sistema de circulação da água dos tanques de terra da Estação Piloto de Piscicultura de Olhão, usados no desenvolvimento da experiência IMTA-Effect (realçados a branco e respetiva terminologia atribuída), Adaptado Google maps, 2016 (1: as setas “vermelhas” representam o sistema de circulação interna da água nos tanques; 2: as setas “pretas” representam o percurso de saída da água dos tanques para o tanque da decantação).	9
<b>Figura 3 -</b> Representação esquemática do ensaio.	10
<b>Figura 4-</b> Processo de raspagem do muco na pele do peixe na região dorsal e acondicionamento em eppendorfs refrigerados.	11
<b>Figura 5-</b> Esquema das diluições decimais ( $10^0, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$ ) a partir do pool e o processo de plaqueamento.	12
<b>Figura 6 -</b> Produção da enzima amilase.	14
<b>Figura 7 -</b> Colonias bacterianas no meio TCBS.	15
<b>Figura 8 -</b> Processo de incubação das bactérias no meio O-F. a) 1º dia de incubação; b) após 4 dias de incubação.	16
<b>Figura 9 -</b> Variação dos teores de bactérias marinhas totais (A), <i>Vibrionaceae</i> (B), e <i>Pseudomonas</i> spp. (C) ao longo do período de amostragem nos três sistemas IMTA: IMTA-1: Peixes + ostras + algas; IMTA-2: Peixes + ostras e IMTA-3: Peixes + macroalgas.	22
<b>Figura 10 -</b> Relação entre os parâmetros microbiológicos e o índice de condição das corvinas ( <i>Argyrosomus regius</i> ) no IMTA-1: Peixes + ostras + macroalgas. (TSA: Bactérias marinhas totais, TCBS: <i>Vibrionaceae</i> , PS: <i>Pseudomonas</i> spp., IC- índice de condição).	23
<b>Figura 11 -</b> Representação gráfica da análise de componentes principais para a verificação da relação entre os parâmetros físico-químicos, microbiológicos e índice de condição das corvinas ( <i>Argyrosomus regius</i> ) no IMTA-1: Peixes + ostras + macroalgas. (TSA: Bactérias marinhas totais, TCBS: <i>Vibrionaceae</i> , PS: <i>Pseudomonas</i> spp., IC- índice de condição).	24
<b>Figura 12 -</b> Relação entre os parâmetros microbiológicos e o índice de condição das corvinas ( <i>Argyrosomus regius</i> ) no IMTA-2: Peixes + ostras. (TSA: Bactérias marinhas totais, TCBS: <i>Vibrionaceae</i> , PS: <i>Pseudomonas</i> spp., IC- índice de condição).	25
<b>Figura 13 -</b> Representação gráfica da análise de componentes principais para a verificação da relação entre os parâmetros físico-químicos, microbiológicos e índice de condição das corvinas ( <i>Argyrosomus regius</i> ) no IMTA-2: Peixes + ostras. (TSA: Bactérias marinhas totais, TCBS: <i>Vibrionaceae</i> e PS: <i>Pseudomonas</i> spp., IC- índice de condição).	26
<b>Figura 14 -</b> Relação entre os parâmetros microbiológicos e o índice de condição das corvinas ( <i>Argyrosomus regius</i> ) no IMTA-3: Peixes + macroalgas. (TSA: Bactérias marinhas totais, TCBS: <i>Vibrionaceae</i> , PS: <i>Pseudomonas</i> spp., IC- índice de condição).	27
<b>Figura 15 -</b> Representação gráfica da análise de componentes principais para a verificação da relação entre os parâmetros físico-químicos, microbiológicos e índice de condição das corvinas ( <i>Argyrosomus regius</i> ) no no IMTA-3: Peixes + macroalgas. TSA: Bactérias marinhas totais, TCBS: <i>Vibrionaceae</i> , e PS: <i>Pseudomonas</i> spp., IC- índice de condição).	27

**Figura 16** - Abundância relativa (%) dos gêneros bacterianos identificados nos três sistemas de cultivo IMTA, IMTA-1: Peixes + ostras + macroalgas; IMTA-2: Peixes + ostras e IMTA-3: Peixes + macroalgas, ao longo do período de amostragem. .... 29

## **INDICE DE TABELAS**

**Tabela 1** - Densidade inicial (Kg/m<sup>3</sup>) dos organismos usados no ensaio. .... 10

**Tabela 2** - Valores médios e desvio padrão dos parâmetros físico-químicos da água dos três sistemas IMTA, IMTA-1: Peixe +ostras + macroalgas; IMTA-2: Peixe + ostras e IMTA-3: Peixes + macroalgas. .... 19

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

- API – Índice de Perfil Analítico
- UFC's- Unidades formadoras de colônias
- EPPO – Estação piloto de piscicultura de Olhão
- FAO- Food and Agriculture Organization
- FNU - Unidades Nefelométricas de Formazina
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- Peroxido de oxigénio
- IC- Índice de condição
- IMTA- Aquacultura multitrófica integrada
- IPMA- Instituto português do mar e atmosfera
- OD - Oxigénio dissolvido
- TSA- Trypticase soy agar,
- TCBS- Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose
- PS- Pseudomonas
- PSU - Unidade de Salinidade Prática

## 1.INTRODUÇÃO

A aquacultura consiste na produção de organismos aquáticos em cativeiro, como peixes, moluscos, crustáceos, equinodermes, anfíbios e/ou plantas, durante pelo menos uma fase da sua vida, envolvendo algum tipo de intervenção do homem de forma a permitir a sua reprodução e manutenção, através das práticas como a alimentação artificial, proteção contra os predadores, integração com outras espécies, entre outros, visando o aumento da produção (FAO, 2009).

Em termos de volume de produção, a aquacultura mundial é dominada por espécies de níveis tróficos superiores, nomeadamente pela produção de peixes na ordem de 50% e de plantas na ordem dos 25% da biomassa produzida (FAO, 2012). Nos últimos anos, tem sido responsável pelo aumento da oferta de pescado sempre que comparada com a pesca no meio natural (FAO, 2014). Atualmente a produção de peixes em aquacultura representa 41,1% do total do pescado consumido a nível mundial (FAO, 2016).

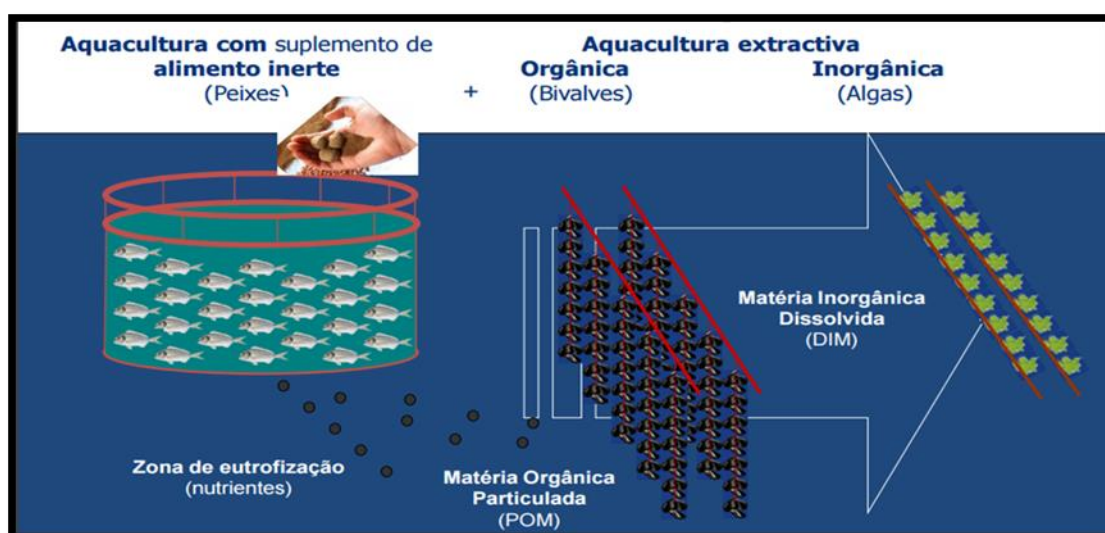
A prática de aquacultura tende a maximizar o crescimento, desempenho, eficiência alimentar e resistência dos organismos aquáticos, tendo como finalidade a redução dos custos na produção para se tornar uma actividade rentável (Denev *et al.*, 2009; Aguirre-Guzmán *et al.*, 2012). Nos últimos anos, têm vindo a ser observados inúmeros avanços ligados a esta actividade, bem como o interesse na sustentabilidade destes sistemas de produção a nível mundial (Zhang *et al.*, 2011).

A aquacultura multitrófica integrada (Integrated Multitrophic Aquaculture – IMTA) é um método inovador de produção de organismos aquáticos, diferente da aquacultura convencional uma vez que, envolve o cultivo integrado de diferentes espécies com níveis tróficos diferentes (Barrington *et al.*, 2009) e pode representar uma solução para a sustentabilidade ambiental desta atividade em determinadas áreas. O IMTA não é um conceito novo, há vários séculos que o sistema IMTA é utilizado nos países asiáticos, especialmente na China. Na Europa e Canada os estudos começaram acerca de 5 décadas atrás, e só recentemente o conceito vem ganhando visibilidade (Hughes *et al.*, 2016).

Em Portugal o IMTA é desenvolvido em tanques de terra na Estação Piloto de Piscicultura de Olhão – EPPO (IPMA) (Cunha *et al.*, 2016), e outras zonas do país, particularmente em Aveiro (Algaplus e Materáqua) onde estão a produzir ostras e macroalgas combinadas com produção natural de peixe (Marques, 2015).

### 1.1.1. Aquacultura Multitrófica Integrada

O IMTA é um sistema de cultivo que permite o aproveitamento de forma sustentável da energia e matéria, através da reciclagem dos nutrientes, possibilitando um manejo equilibrado do ecossistema. Este sistema permite a integração de organismos de diferentes níveis tróficos, os quais desempenham funções biológicas complementares, combinado com proporções adequadas. É bastante diferente do sistema convencional, em que são cultivadas em conjunto uma ou mais espécies com o mesmo nível trófico, partilhando os mesmos processos biológicos e químicos, o que posteriormente pode potencializar um maior impacto ambiental (Chopin *et al.*, 2008). No sistema IMTA há integração do cultivo de espécies de aquacultura alimentada artificialmente, (como peixes ou camarão) com o cultivo de espécies de aquacultura extractiva orgânica (moluscos) e de aquacultura extrativa inorgânica (algas), criando sistemas ambientalmente estáveis (Figura 1) (Chopin *et al.*, 2008; Cunha *et al.*, 2016).



**Figura 1-** Representação esquemática do funcionamento sistema IMTA (Adaptado de Chopin, 2006).

Os sistemas IMTA podem envolver varias combinações de espécies, e pode ser realizado em sistemas marinhos ou dulçaquícolas, em águas terrestres ou abertas (Neori *et al.*, 2004). Alguns sistemas incluem combinações como: “peixes, moluscos, algas”, “peixes, camarão, algas”, etc. passando a ser um sistema dinâmico que se altera de acordo com as variáveis, espécies, localização, época e meio ambiente, visando imitar um sistema natural (Troell *et al.*, 2003).

Os nutrientes orgânicos libertados da produção de peixes, que causariam a eutrofização do fundo e o conseqüente aumento da matéria orgânica, servem de fonte de alimento para as espécies extrativas de nutrientes orgânicos e inorgânicos, permitindo a mitigação do problema do baixo teor de oxigénio da água, causado pelo aumento do consumo de oxigénio durante a decomposição bacteriana da matéria orgânica por excesso (Marinho-Soriano *et al.*, 2011). Neste contexto, o sistema IMTA pode ser considerado, como uma alternativa de forma a manter a sustentabilidade dos ecossistemas aquáticos, por meio da biomitigação dos resíduos da aquacultura, e diversificação económica da actividade (Barrington *et al.*, 2009; Cunha *et al.*, 2016).

A pratica de aquacultura em sistema intensivo ou semi-intensivo, visado a obter altas densidades em tão pouco tempo, pode levar à possibilidade de exposição a alta densidade de agentes patogénicos como parasitas, bactérias, vírus, fungos, etc., que pode causar doenças e altas taxas de mortalidades (Laidler *et al.*, 1999), bem como levar à perda económica das empresas ligadas à área piscícola (Pilcher & Fryer, 1980). Uma vez, que os peixes vivem em íntimo contacto com o meio ambiente através das branquias e da pele, a manutenção da qualidade da água é imprescindível para o bem-estar dos peixes, porque influencia na variação dos microrganismos dentro dos sistemas de cultivo (Mellor & Stafford, 2001).

### **1.1.2. Comunidade bacteriana da pele dos peixes**

Os organismos vivos possuem uma comunidade diversificada de microrganismos que vivem em associação com as superfícies mucosas, denominado por microbiota. Em condições normais, os peixes possuem uma microbiota saudável, que forma uma barreira protetora nas superfícies mucosas contra os agentes patogénicos. Portanto, flutuações normais na estrutura da comunidade microbiana são esperadas devido a

mudanças nos factores ambientais como a temperatura, salinidade, teor de oxigénio e presença de matéria orgânica (Larsen & Arias, 2014).

A colonização bacteriana na superfície externa e interna do peixe (incluindo o muco, a pele, as branquias e o trato digestivo) dependem entre outros factores, do estado de saúde do peixe. Naturalmente, a colonização pode começar no ovo e/ou fase larval, seguindo com o desenvolvimento do peixe (Olafsen, 2001). Deste modo, o número e variedade de microrganismos existentes no ovo, nos alimentos e água, vai afetar a microbiota do peixe em desenvolvimento (Austin, 2006).

Em águas temperadas, é observado um aumento excessivo na quantidade de bactérias encontradas no ambiente aquático, especialmente em ambiente altamente eutrofizados na época de verão. Consequentemente, no inverno com a deficiência de nutrientes na água a comunidade bacteriana é diferente (Magarinos *et al.*, 2001). Dada a influência da estação do ano na variação da comunidade bacteriana, possivelmente, o estudo da comunidade ao longo do tempo é o mais ideal, para se entender os vários processos e mecanismos que envolvem a sucessão bacteriana nos sistemas aquáticos.

Em tanques de piscicultura a carga bacteriana é maior nos meses de verão, devido os altos níveis de compostos orgânicos em suspensão. As bactérias predominantes são dos géneros: *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* e *Vibrio* (Roberts *et al.*, 2009).

Os *Vibriões* são as principais bactérias que colonizam o muco da pele dos peixes marinhos. As diversas espécies deste género têm diferentes nichos ecológicos, porém, encontram-se geralmente distribuídas em ambientes estuarinos e/ou marinhos (Thompson *et al.*, 2007). A maior parte das espécies é mesófila aumentando em número durante o verão (Anacleto *et al.*, 2013). As principais espécies marinhas de *víbrios* correlacionadas com doenças em peixes são: *Vibrio alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. salmonicida*, *V. Ordalii*, *V. parahaeemolyticus*, *V. vulnificus* e *Photobacterium damsela* sub. *piscicida* (Diggles *et al.*, 2000). As vibrioses são identificadas como doenças secundárias e oportunistas, que se expressam geralmente no decorrer de um desequilíbrio (aumento rápido) na população bacteriana deste género (Ghittino *et al.*, 2003; Toranzo *et al.*, 2005; Austin & Zhang, 2006), ou desencadeadas por

circunstâncias ambientais e /ou nutricionais adversas num cultivo, circunstâncias estas que serão determinantes na severidade do surto (Jun & Woo, 2003).

Apesar das principais espécies de bactérias conhecidas como patogénicas para peixes, serem aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, algumas anaeróbicas restritas têm sido isoladas no intestino dos peixes, o que sugere que é difícil definir uma lista discriminada de bactérias patogénicas, devido à alta possibilidade de transformação de bactérias não virulentas em estirpes virulentas, devido à transferência de genes entre as bactérias (Rachel e Beverly, 2003), bem como sistema *quorum sensing* (QS), que é um poderoso dispositivo que as bactérias utilizam contra as respostas imunitárias do hospedeiro (Defoirdt *et al.*, 2010; Papenfort & Bassler, 2016). Segundo Corte's *et al.*, (2011), para se compreender os mecanismos de ligação das bactérias ao muco e a pele, e os factores que controlam esta ligação, é necessário conhecer vários factores como, componentes da superfície, hidrofobicidade, viscosidade, pH do meio, fluxo da água, etc.

Como descrito anteriormente, que os peixes permanecem numa relação íntima com o ambiente em que vivem, havendo muitas semelhanças entre as populações bacterianas dos peixes e água, uma vez que os géneros de bactérias existente no muco da pele aparenta ser semelhante ao do meio ambiente ou dieta (Apun *et al.*, 1999; Diler *et al.*, 2000; Austin & Zhang, 2006). Todos os factores inerentes manutenção, sustentabilidade e qualidade da água do meio envolvente, influenciaram na modulação das populações bacterianas (Bernadsky & Rosenberg, 1992).

#### **1.1.2.1. Importância da microbiota da pele do peixe**

Os peixes devido ao seu modo de vida, precisam de desenvolver estratégias eficazes para superar tanto as variações do meio ambiente, como a presença de agentes patogénicos sejam eles de origem biológica ou química. Sendo assim, o muco da pele dos peixes constitui a primeira barreira de defesa do organismo. O muco da pele do peixe consegue neutralizar ou inibir a formação de biofilme bacteriano e os seus efeitos, uma vez que é impermeável à maioria das bactérias e a vários patogénicos, immobilizando-os antes que entrem em contacto com as superfícies epiteliais (Cone, 2009). A adesão bacteriana a superfícies e tecidos externos é o primeiro passo principal, na colonização dos tecidos hospedeiros e posterior ocorrência de infeção em regimes patogénicos (Montgomery & Kirchman, 1994), processo mediado pelas adesinas que

são complexos proteicos que se comunicam com os receptores existentes na superfície da célula hospedeira (Hacker, 1992; Hoepelman & Tuomanen, 1992).

Nos peixes a camada mucosa está associada a diversas actividades importantes, tais como regulação osmótica, locomoção, proteção mecânica, trocas gasosas, e actividades antibacterianas contra diferentes patógenos, devido ao mecanismo de competição com a microbiota presente no muco e influência das correntes (Fouz *et al.*, 1991; Alexander *et al.*, 1992; Westerdahl *et al.*, 1999; Mayer, 2003). As bactérias marinhas podem desenvolver biofilmes na coluna da água, resistindo dessa maneira a esses mecanismos, situação que pode induzir a doenças nos organismos em condições adversas. Contrariamente os peixes saudáveis impedem a colonização permanente, substituindo e segregando continuamente o muco nas superfícies mucosas (Nagashima *et al.*, 2003). A qualidade de vida dos peixes produzidos em cativeiro e/ ou na natureza dependerá do equilíbrio dos três factores essenciais para a sua manutenção, o ambiente, saúde do peixe e agentes patogénicos, dado que, o desequilíbrio dos mesmos desencadeará a ocorrência de doenças (Balebona, 1994).

Segundo Benhamed *et al.*, (2014), o muco da pele do peixe pode estar associado, a uma função seletiva de discriminar entre estirpes de bactérias patogénicas e comensais, o que desempenha um papel fundamental nos mecanismos de defesa dos peixes. Mecanismos estes que podem estar envolvidos na produção de substâncias antimicrobianas, competição por nutrientes ou receptores de adesão, inibição da expressão de genes de virulência, e resposta imune (Nikoskelainen *et al.*, 2003; Kim & Austin, 2006; Balcazar *et al.*, 2007; Gomez & Balcazar, 2008 ). Estudos realizados por Richards *et al.*, (2001) e Fernandes *et al.*, (2002), revelam que a superfície mucosa de alguns peixes também contém uma série de péptidos antimicrobianos que exercem uma actividade contra bactérias tanto Gram negativas como Gram positivas.

A realização deste estudo, será mais um contributo para a caracterização da comunidade bacteriana que vive associada ao muco da pele de peixes de aquacultura marinha, uma vez que, a maioria dos estudos existentes, estão relacionados com a caracterização da microbiota bacteriana existente no trato digestivo, maioritariamente de peixes alimentados com ração modificada ou suplementada com probióticos usados para melhoria do sistema imunitário e assimilação dos nutrientes. Segundo Ringo *et al.*,

(2000) e Makridis *et al.*, (2005) a superfície mucosa externa não pode ser estudada separadamente da situação geral da saúde dos peixes, visto que, o estado de saúde do peixe é fortemente dependente da microbiota interna. Uma compreensão geral sobre microbiota bacteriana do muco da pele de peixes nos sistemas IMTA, poderia ser útil para se perceber a influência dos organismos de aquacultura com suplemento de alimento inerte e aquacultura extrativa orgânica e inorgânica na qualidade microbiológica da água.

### **1.2. OBJETIVO GERAL**

O principal objetivo deste trabalho foi caracterização da comunidade bacteriana do muco da pele de corvinas cultivadas em tanques de terra em diferentes sistemas integrados IMTA. Uma vez que o muco da pele do peixe tem um papel fundamental no sistema de defesa/imunitário dos peixes contra os agentes patogénicos existentes no meio ambiente. A análise do mesmo poderá dar uma visão geral sobre a qualidade microbiológica da água.

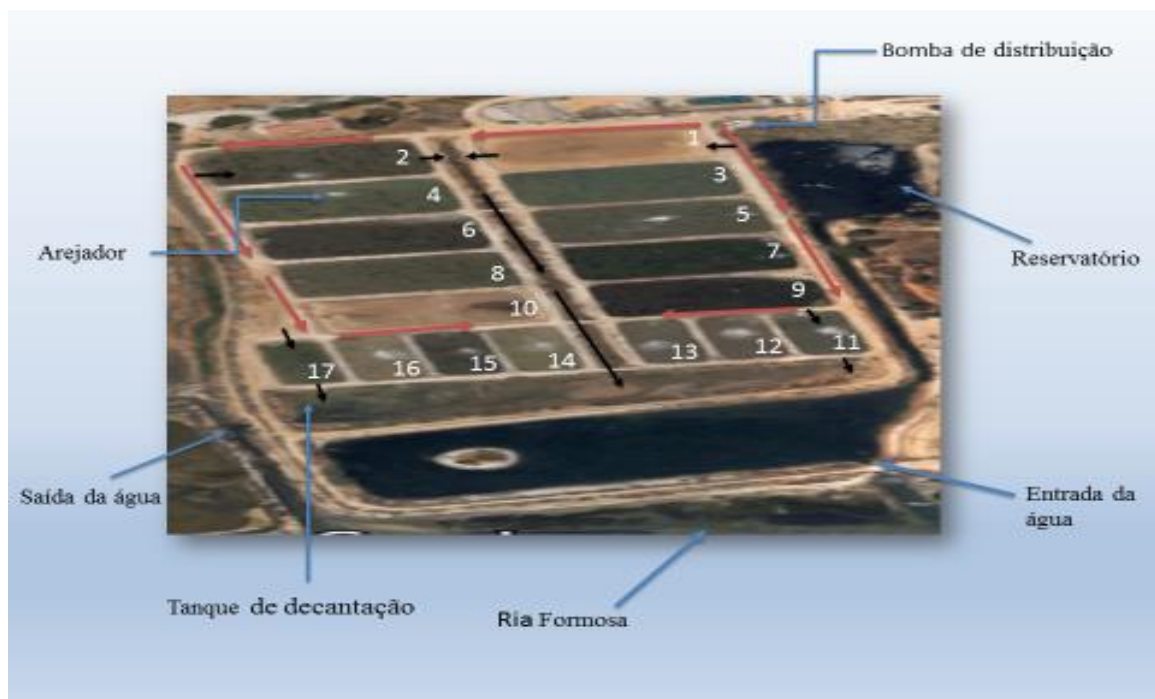
### **1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Caracterizar a microbiota bacteriana associada ao muco de corvinas produzidas em sistemas multitróficos integrados com ostras e macroalgas;
- b) Verificar se o facto de existirem macroalgas ou ostras nestes sistemas de produção, altera a microbiota bacteriana associada ao muco da pele dos peixes cultivados;
- c) Avaliar os parâmetros de crescimento dos indivíduos produzidos e a variação dos parâmetros físico-químicos da água, temperatura, salinidade, pH, oxigénio dissolvido e turbidez.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Caracterização da área de estudo

O estudo foi realizado em tanques de terra em Olhão, no Instituto Português do Mar e Atmosfera (IPMA), na Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO) localizada no parque natural da Ria Formosa e teve a duração de sete meses (maio a novembro de 2016). A água utilizada no cultivo dos peixes é proveniente da Ria Formosa, através de um sistema de circulação de água aberto, entrando por um ponto da Ria e saindo pelo outro, sob influência das marés (Figura 3). De maneira a diminuir as alterações nos resultados por factores externos, todos os parâmetros relacionados com o sistema de circulação da água tais como, volume do tanque, altura da coluna da água, caudal e outros, foram mantidos o mais semelhantes possível. Os parâmetros físico-químicos da água, temperatura, oxigénio dissolvido, pH e turbidez foram medidos diariamente durante a manhã pelas 9 horas.



**Figura 2-** Descrição esquemática do sistema de circulação da água dos tanques de terra da Estação Piloto de Piscicultura de Olhão, usados no desenvolvimento da experiência no ensaio IMTA (realçados a branco e respetiva terminologia atribuída), Adaptado Google maps, 2016 (1: as setas “vermelhas” representam o sistema de circulação interna da água nos tanques; 2: as setas “pretas” representam o percurso de saída da água dos tanques para o tanque da decantação).

### 2.1.1. Desenho experimental

Para a realização deste ensaio, procedeu-se a um desenho experimental composto por três sistemas de cultivo IMTA com dois replicados, distribuídos em seis tanques de terra semelhantes em capacidade e biomassa de peixes, com 1,5 m de profundidade e área de 750 m<sup>3</sup>, diferindo apenas na presença ou ausência de ostras ou macroalgas, respectivamente. Como representado na figura 4 abaixo:

<b>IMTA-1</b>	Peixes + ostras + macroalgas	Tanque 11
		Tanque 16
<b>IMTA-2</b>	Peixes + ostras	Tanque 12
		Tanque 14
<b>IMTA-3</b>	Peixes + macroalgas	Tanque 13
		Tanque 15

**Figura 3-** Representação esquemática do ensaio.

Os tanques foram povoados com corvinas (*Argyrosomus regius*), sargos (*Diplodus sargus*) e tainhas, (*Mugil cephalus*) de acordo com as características evidenciadas na tabela 1. As ostras (*Crassostrea* spp.) foram distribuídas em sacos fixos em *long-lines* e as macroalgas (*Ulva* spp.) estiveram dispostas em jangadas flutuantes substituídas semanalmente. Troficamente os sistemas estavam divididos por consumidores (corvinas, sargos, tainhas, ostras e zooplâncton) e produção primária (algas, bactérias e fitoplâncton).

**Tabela 1-** Densidade inicial (Kg/m<sup>3</sup>) dos organismos usados no ensaio.

Espécies	Número inicial	IMTA-1		IMTA-2		IMTA3		Peso médio (g)	Biomassa (Kg)	Densidade (Kg.m <sup>3</sup> )
		Tanque 11	Tanque 16	Tanque 12	Tanque 14	Tanque 13	Tanque 15			
<i>A. regius</i>	9000	1500	1500	1500	1500	1500	1500	200	300	0,4
<i>D. sargus</i>	5100	850	850	850	850	850	850	65	55	0,07
<i>M. cephalus</i>	3300	550	550	550	550	550	550	100	55	0,07
<i>Crassostrea</i> . spp.	72000	18000	18000	18000	18000	-	-	3	54	0,07
<i>Ulva</i> spp.	1200g	300g	300g	-	-	300g	300g	-	0.3	0.0004

### 2.1.2. Amostragem de parâmetros físico-químicos da água

Para a determinação dos parâmetros físico-químicos da água, nomeadamente temperatura, salinidade, pH, oxigénio dissolvido e turbidez foi utilizada a sonda multiparameter HANNA- modelo HI 9829.

### 2.1.3. Amostragem biológica

Mensalmente durante o período de estudo, recolheram-se seis corvinas de cada tanque de terra, com recurso a pesca à cana, os mesmos foram mantidos vivos em baldes contendo água dos respetivos tanques de origem, de maneira a não alterar a microbiota do muco dos peixes (Figura 5). Logo após a recolha do muco foi determinado o peso e comprimento total dos peixes amostrados.



**Figura 4-** Processo de raspagem do muco na pele do peixe na região dorsal e acondicionamento em eppendorfs refrigerados.

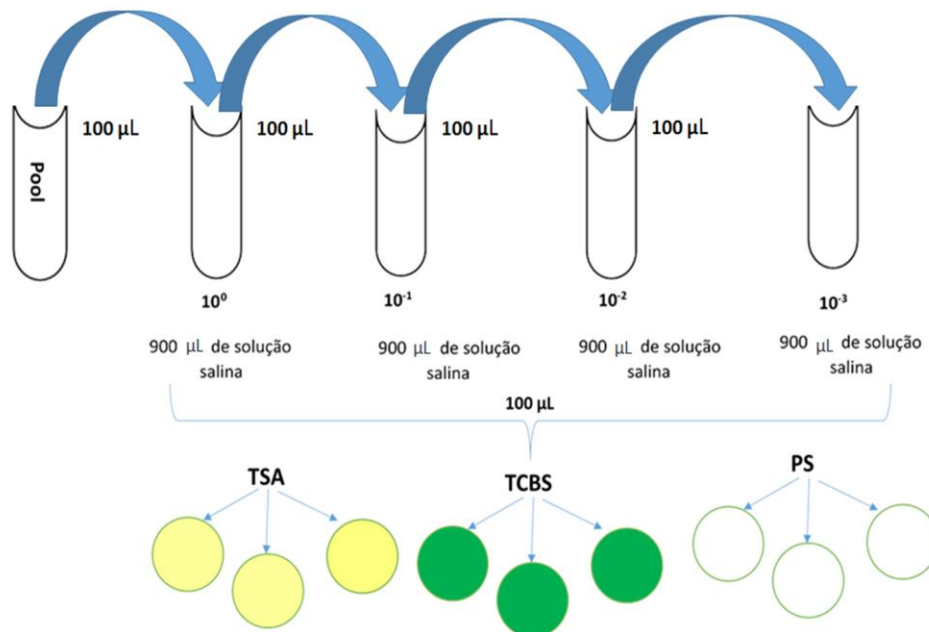
#### 2.1.3.1. Preparação dos meios de culturas

Os meios de cultura usados foram preparados com água destilada (suplementado com NaCl), de acordo com as instruções do fabricante, exceto o meio *Pseudomonas*-CN que foi preparado com água do mar filtrada. O Trypticase soy agar (TSA) (OXOID) é um meio não específico, que foi usado para obtenção do número de bactérias totais, enquanto o Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose (TCBS) (OXOID), como é um meio seletivo, foi usado para isolar bactérias da família *Vibrionaceae*, não permitindo o crescimento de bactérias de géneros diferentes. O mesmo acontece com o meio

*Pseudomonas*-CN (PS) (BIOKAR), específico para o crescimento de bactérias do género *Pseudomonas*. Após a preparação, todos os meios foram esterilizados em autoclave à temperatura de 121° C durante 15 minutos, em seguida, os meios foram transferidos dentro da câmara de fluxo laminar, onde foram vertidos em placa de petri (aproximadamente 15 ml) e deixados a solidificar durante 30 minutos, seguindo-se a marcação e o armazenamento até a utilização dos mesmos.

### 2.1.3.2. Cultivo, isolamento e seleção das bactérias

Para o cultivo da microbiota presente no muco das corvinas fez-se um *pool*, através da mistura do muco dos peixes amostrados para cada sistema IMTA (n=12), num eppendorf contendo 900 µL de solução salina estéril. Após homogeneização, foram efectuadas sucessivas diluições ( $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) (figura 6). De cada uma das diluições, inoculou-se 100 µL em placas, com meios TSA, TCBS ou PS em triplicado para cada sistema IMTA, pelo método de espalhamento com alça Drigalski. Em seguida incubou-se na estufa a 23°C durante uma semana, sendo as colónias contadas às 48 horas e aos sete dias.



**Figura 5-** Esquema das diluições decimais ( $10^0, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$ ) a partir do pool e o processo de plaqueamento.

Durante o período de incubação registou-se a existência ou não de crescimento de colónias bacterianas, realizando-se a contagem das colónias após 48h e 7 dias, validando-se as placas cujo valor de unidades formadoras de colónias (ufc's) estavam compreendidas entre 30 e 300 ufc's. As colónias mais representativas foram selecionadas, com a ajuda de uma ansa estéril descartável, uma porção das colónias selecionadas foram repicadas em TSA através de estrias de proliferação por 48 horas, repetiu – se o mesmo processo de repicagem até se obter as colónias totalmente puras. Todos os dados microbiológicos das amostras de muco da pele de corvinas produzidas, nos diferentes sistemas de cultivo integrados IMTA foram expressados em  $\text{Log}_{10}$  ufc's. g<sup>1</sup>.

### **2.1.3.3. Identificação bioquímica das bactérias**

Após isoladas e purificadas, as bactérias foram repicadas em TSA durante 24 horas afim de se proceder à sua identificação bioquímica de acordo Holt (1994) e Buller (2004). Para cada isolado, foram feitos os testes de Gram (KOH a 3%), catálase, oxidase, amilase, forma / mobilidade, luminescência, crescimento na ausência ou presença de sal (0% NaCl, 3% NaCl, 5% NaCl e 10%NaCl), TCBS e Oxidação – Fermentação (O-F).

## **2.2. Seleção de Gram (método de Levi)**

O teste de Gram (KOH a 3 %) tal como a coloração de Gram, permite diferenciar as bactérias em dois grupos, bactérias Gram positivas e negativas. O KOH a 3% dissolve a parede celular das bactérias Gram –, devido a uma camada fina de peptidoglicano que possuem, diferente das bactérias Gram +. Com auxílio de um palito estéril retirou-se um pouco da colónia fresca e misturou-se numa gota de KOH a 3% durante 5 a 10 segundos. Após este tempo, retirou-se cuidadosamente o palito e observou-se a formação ou não de um fio de muco. Na eventualidade de formação do fio do muco, trata-se de bactérias Gram negativas, caso contrário, tratam-se de bactérias Gram positivas.

### **2.2.1. Teste de catálase**

Esse teste baseia-se na acção da enzima catálase metabolizar  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Retirou-se um pouco da colónia fresca com ajuda de um palito estéril, e misturou-se numas gotas de

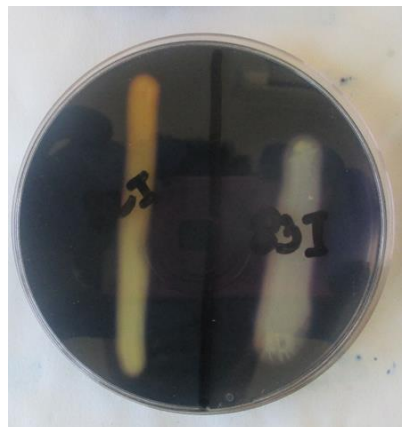
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, considerando como resultado positivo a formação imediata de bolhas gasosas, (libertação de O<sub>2</sub>), e negativo a ausência de bolhas.

### 2.2.2. Teste de oxidase

O teste oxidase foi utilizado para detecção da acção desta enzima. Para tal, com auxílio de um palito estéril retirou-se uma pequena porção da colônia fresca e espalhou-se numa parte de uma fita de oxidase (Oxoid MB0266 oxidase detection strips), esperou-se alguns segundos, até revelar o aparecimento da cor violeta / roxa escura indicando um resultado positivo e a ausência negativo.

### 2.2.3. Prova de utilização da amílase

O teste de produção da enzima amílase, foi efetuado através da inoculação das bactérias em placas de Petri com meio de cultura, contendo agar nutritivo + amido salubre, suplementado com 1,5% de NaCl. As placas foram incubadas durante 24 horas e em seguida realizaram-se as leituras. Para tal, foi adicionado aproximadamente 5ml de lugol e mantido alguns minutos. Em seguida, a solução foi descartada e analisou-se a presença de um halo claro em torno da colônia, indicando a presença da enzima. (Figura 7).



**Figura 6-** Produção da enzima amílase.

### 2.2.4. Forma / Mobilidade

Para determinação da forma / mobilidade colocou-se uma gota de suspensão da colônia previamente diluída em solução salina 1,5% numa lamina e sobre a gota uma lamela, e em seguida identificou-se ao microscópio a 1000x para verificar a forma e mobilidade das bactérias.

### 2.2.5. Crescimento na ausência ou presença de sal

Para o crescimento na ausência ou presença de sal, utilizou-se um meio basal suplementado com cloreto de sódio (concentração final: 3, 5 e 10% de sal), e incubou-se durante 24 - 48 horas, observando-se a ocorrência de crescimento bacteriano.

### 2.2.6. Caracterização do crescimento das bactérias em meio específico para *Vibrionaceae* (TCBS).

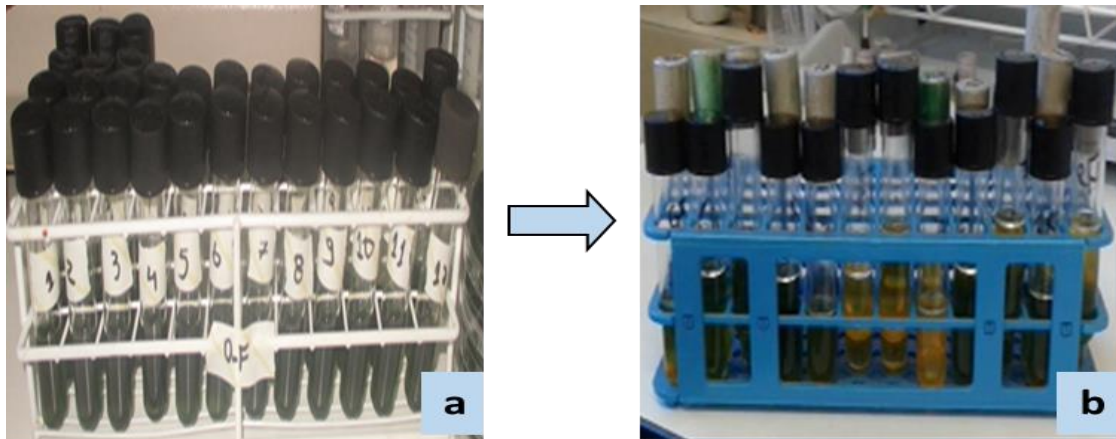
As colônias bacterianas isoladas foram repicadas e inoculadas em placas contendo meio de cultura TCBS durante 24 horas, observando-se a ocorrência de colônias laranjas e verdes (Figura 8).



**Figura 7-** Colônias bacterianas no meio TCBS.

### 2.2.7. Prova de utilização da D- Glucose (O-F)

Para a determinação do teste Oxidação – Fermentativa (O-F), foi utilizado o meio de cultura- OF basal medium (DIFCO<sup>R</sup>), suplementado com 1% de D-glucose. Cada bactéria isolada foi inoculada em dois tubos com o meio por picada com cultura fresca, sendo um dos tubos selado com parafina líquida e incubado durante 4 dias. (Figura 9).



**Figura 8-** Processo de incubação das bactérias no meio O-F. a) 1º dia de incubação; b) após 4 dias de incubação.

Após o período de incubação, a observação de cor amarela em ambos os tubos indicou fermentação ácida a D-glucose, ambos tubos verdes ou alternado com amarelo fermentação não oxidativa, e ambos tubos verdes negativa.

Todas as bactérias isoladas que deram positivo ao grupo bacilos Gram – não entéricas, segundo manual de identificação Bergey's (Holt, 1994), foram analisadas utilizando-se as galerias do kit API20 NE em conjunto com os resultados obtidos com os testes bioquímicos realizados. Teve-se em consideração que as colónias utilizadas para esta galeria tivessem 24-48h de crescimento em TSA. Com auxílio de uma zaragatoa estéril coletou-se uma porção da colônia bacteriana e foi suspensa e homogeneizada em uma ampola de API NaCl 0,85 AUX Medium (7ml) até sendo possível a visualização da turbidez do meio, e com ajuda de uma pipeta de Pasteur estéril, inoculou-se a solução para o Kit API 20NE (BioMérieux, França), repetindo-se o processo para cada bactéria isolada. O kit foi utilizado conforme as instruções do fabricante e foram incubados a 23°C durante 48 horas.

Associados aos testes existentes no Kit fez-se os testes de aminoácidos (lisina, ornitina e arginina) que consistiu em inocular 100µL de solução bacteriana à 1,5% de sal em eppendorfs para cada um dos aminoácidos, sendo selados com algumas gotas de parafina líquida e em seguida incubadas durante 48 horas, tomando como resultado positivo o aparecimento de uma cor violeta e negativa por uma coloração amarela, bem

como o antibiograma para determinação do perfil qualitativo de resistência a antibióticos, através de discos de difusão, utilizando ágar Muller Hinton.

Os antibióticos usados foram ampicilina 25µg e agente vibriostático O/129 10µg. Os discos de papel com antibióticos foram dispostos, com ajuda de uma pinça previamente esterilizada, sobre a superfície do ágar Muller Hinton, previamente inoculados com as bactérias testadas. Após a incubação das placas contendo os discos de antibióticos a 23°C durante 24 horas, realizou-se a leitura das mesmas, medindo-se os diâmetros dos halos de inibição de crescimento em milímetros, confrontado com a tabela padrão para os testes de suscetibilidade a antibióticos, sendo classificadas como sensíveis ou resistentes.

### 2.3. Análises estatísticas

Todos os dados foram expressos e analisados em médias, e de modo a determinar a presença de variação estatisticamente significativa entre os sistemas IMTA, foi utilizado a análise de variação unidirecional (**one-way ANOVA**) e o **teste de Tukey**, com recurso ao programa do Microsoft Office Excel 2010, com nível de confiança de 95% ( $p \leq 0,05$ ). Foi utilizada uma **análise de componentes principais** (PCA), contendo o teor de bactérias marinhas totais (determinados em TSA), teor de *Vibrionaceae* (TCBS), teor de *Pseudomonas* (PS), índice de condição (IC) e os parâmetros físico-químicos (temperatura, turbidez, salinidade, pH e oxigénio dissolvido medidos *in situ*) para distinguir as principais variáveis responsáveis pela variância dos dados, bem como a existência de correlações entre parâmetros microbiológicos, físico-químicos e índice de condição. Esta análise estatística foi realizada através do software SPSS (Statistical Package for Social Sciences) v.22. Os valores médios do peso e comprimento dos peixes amostrados para cada IMTA, foram utilizados para calcular o índice de condição de Fulton (K), pela formula:  $K = W/L^3 \times 100$ , onde W = Peso (g) e L = comprimento (cm), considerando normal os valores que estiveram próximos ou superior a 1.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Parâmetros físicos-químicos da água

Para o período em estudo, os valores médios dos parâmetros físico-químicos da água, dos tanques de cultivo utilizados, foram agregados por sistemas de cultivo (IMTA 1: tanque 11 e 16; IMTA 2: tanque 12 e 14 e IMTA 3: tanque 13 e 15) (Tabela 2).

**Tabela 2**-Valores médios e desvio padrão dos parâmetros físico-químicos da água dos três sistemas IMTA: IMTA-1: Peixes + ostras + macroalgas; IMTA-2: Peixes + ostras e IMTA-3: Peixes + macroalgas.

<b>IMTA-1</b>					
Meses	Temperatura (°C)	pH	Salinidade (Psu)	DO (mg/L)	Turbidez (FNU)
Mai/16	21,8 ±2,42	8,61 ±0,17	34,96 ±1,10	6,34 ±0,92	12,38 ±5,20
Jun/16	25,0 ±1,80	8,59 ±0,18	36,02 ±0,15	6,87 ±1,13	18,09 ±7,54
Jul/16	27,8 ±1,56	8,49 ±0,19	36,15 ±0,15	6,06 ±0,88	21,24 ±8,22
Ago/16	27,7 ±1,23	8,52 ±0,13	36,54 ±0,20	6,06 ±1,11	20,40 ±8,70
Set/16	25,5 ±2,21	8,43 ±0,12	36,52 ±0,32	5,87 ±0,66	19,10 ±8,04
Out/16	21,4 ±1,70	8,35 ±0,21	35,31 ±1,43	5,43 ±0,90	15,30 ±6,24
Nov/16	17,2 ±2,17	8,29 ±0,18	33,53 ±1,60	5,64 ±0,73	9,90 ±4,54
<b>IMTA-2</b>					
Mai/16	21,8 ±2,40	8,62 ±0,17	34,99 ±1,10	6,42 ±1,04	13,89 ±6,78
Jun/16	25,0 ±1,80	8,58 ±0,16	36,03 ±0,17	6,95 ±1,14	13,40 ±5,70
Jul/16	28,0 ±1,50	8,56 ±0,17	36,16 ±0,14	6,01 ±0,81	15,17 ±4,48
Ago/16	28,0 ±1,20	8,56 ±0,16	36,53 ±0,15	5,97 ±0,97	18,80 ±5,60
Set/16	25,0 ±2,30	8,47 ±0,19	36,16 ±2,33	5,95 ±0,90	19,90 ±7,13
Out/16	21,3 ±1,73	8,25 ±0,16	35,32 ±1,46	5,25 ±0,52	16,24 ±5,62
Nov/16	17,0 ±1,94	8,22 ±0,17	35,33 ±1,22	5,52 ±0,61	14,70 ±7,42
<b>IMTA-3</b>					
Mai/16	21,7 ±2,40	8,62 ±0,16	35,00 ±1,13	6,28 ±0,96	14,60 ±6,62
Jun/16	24,9 ±2,00	8,54 ±0,17	35,97 ±1,06	6,80 ±1,26	22,10 ±17,2
Jul/16	27,8 ±1,00	8,51 ±0,14	36,16 ±0,13	5,77 ±0,75	22,96 ±12,8
Ago/16	28,0 ±1,00	8,49 ±0,12	36,47 ±0,12	5,42 ±0,69	23,52 ±10,2
Set/16	25,0 ±2,00	8,40 ±0,19	36,13 ±3,36	5,49 ±0,68	22,10 ±8,82
Out/16	21,4 ±1,80	8,29 ±0,15	35,42 ±1,34	5,18 ±0,53	16,05 ±6,10
Nov/16	17,0 ±2,10	8,30 ±0,16	35,37 ±1,22	5,17 ±0,51	13,03 ±6,20

No que diz respeito a variação da temperatura nos três sistemas IMTA, pode-se verificar que a estação do ano teve grande influência na oscilação dos mesmos. Os valores médios registados em todos os tanques foram muito similares, uma vez que todos se encontravam ao ar livre influenciados pela temperatura ambiente. Verificou-se um aumento gradual desde maio até julho, mantendo-se contante até agosto (28°C), sendo o mais baixo em novembro (17°C).

Os valores médios de pH oscilaram entre 8,2 e 8,6 ao longo de todo período de amostragem.

Relativamente a salinidade, observou-se que ao longo do período de amostragem os valores médios variaram muito pouco, com os valores mais altos nos meses de verão e as variações mais significativas em novembro. Os teores de sais situaram-se entre 33,55 e 36,54 psu.

Em relação à média da evolução dos níveis de oxigénio dissolvido (OD) nos três sistemas IMTA, os mesmos oscilaram entre 5,24 a 6,95 mg/L, permanecendo relativamente estáveis durante todo período de amostragem, sendo os valores médios mais elevados registados no mês de junho (6,87 mg/L) e os mais baixo em outubro (5,29 mg/L). Analisando de um modo geral os valores, pode-se aferir que os níveis de oxigénio diminuíam com o aumento da temperatura.

Comparativamente aos outros parâmetros estudados, a turbidez foi o que mais oscilou em termos de valores médios, sobre tudo pela influência da variação da temperatura durante o período em estudo. Os níveis mais elevados foram observados desde julho até setembro com uma média de 20 (FNU). Avaliando os três sistemas foi possível perceber que, o IMTA-3 apresentou maiores níveis de turbidez, seguindo-se o IMTA-1 e por último o IMTA-2.

### **3.2. Parâmetros microbiológicos**

#### **3.2.1. Teor de bactérias marinhas totais**

O número de bactérias marinhas totais presentes no muco dos peixes amostrados nos três sistemas IMTA, foram na ordem de  $10^3 - 10^5$  ufc.g<sup>-1</sup>. Ao longo do período de amostragem, os valores mais altos de bactérias marinhas totais foram registadas no mês de maio, enquanto que no período de junho até julho, foram registadas maiores oscilações em relação aos valores médios e os valores mais baixos em outubro e

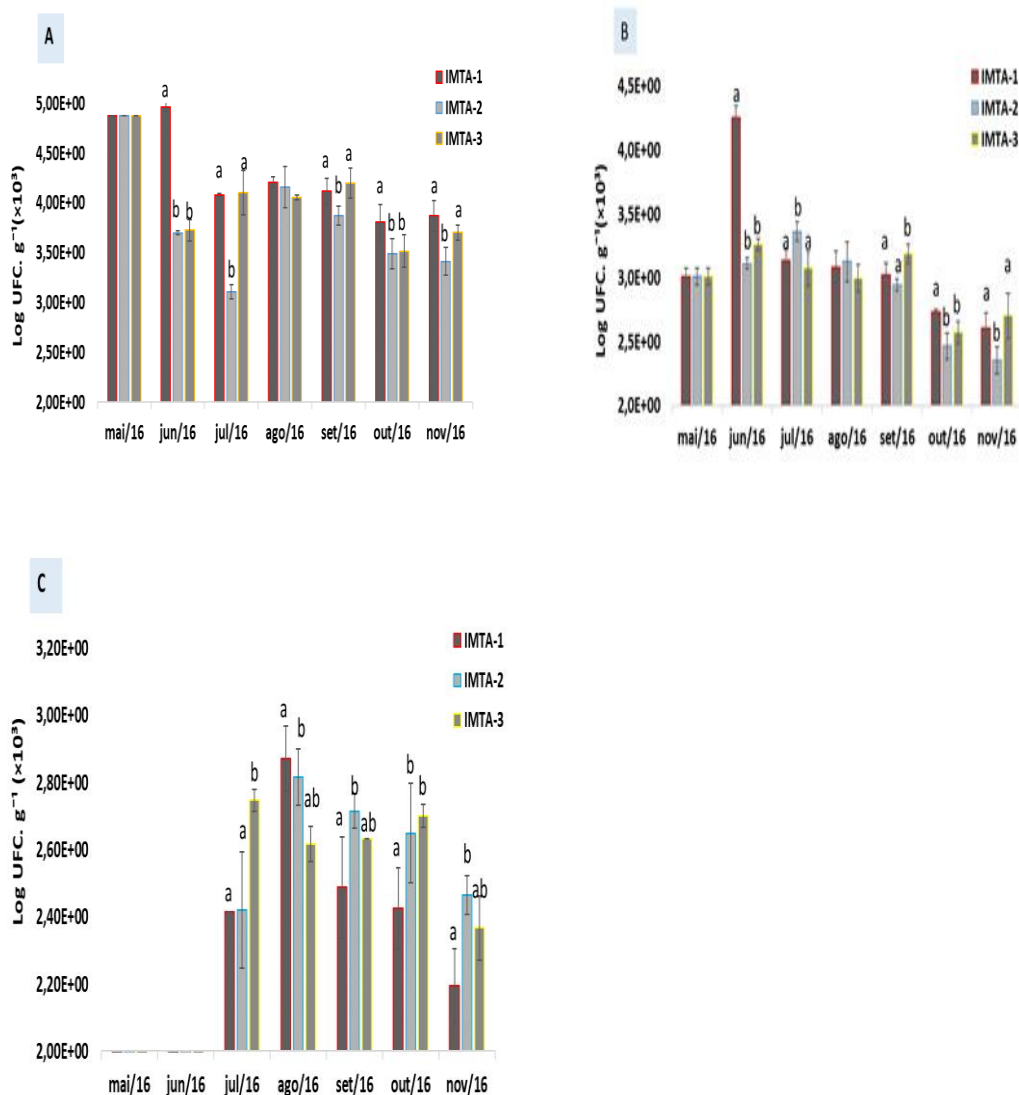
novembro, Porém, foram registadas diferenças estatísticas significantes nos valores médios de bactérias marinhas totais durante o período de amostragem nos três sistemas IMTA (Anova,  $P < 0,05$ ;  $F= 3,86$ ) (Figura 9A).

### **3.2.2. Teor de *Vibrionaceae***

O número de *Vibrionaceae* variou entre  $10^2 - 10^4$  ufc.g<sup>-1</sup>. Os valores médios mais altos foram observados no período de junho até setembro, por conseguinte os meses de outubro e novembro apresentaram os valores mais baixos. Entretanto, foram verificadas diferenças estatísticas significantes na variação da taxa de *Vibrionaceae* ao longo do período de estudo nos três sistemas IMTA (Anova,  $P < 0,05$ ;  $F= 7,67$ ) (Figura 9B).

### **3.2.3. Teor de *Pseudomonas* spp.**

O número de *Pseudomonas* spp. rondou entre  $10^2 - 10^3$  ufc.g<sup>-1</sup>, sendo o que mais variou em termos de valores de ufc's, não apresentando crescimento de colônias viáveis em maio e junho. Os valores mais altos foram observados em agosto e os mais baixos em novembro. Não obstante, foram observadas diferenças estatísticas significativas na variação de ocorrência de *Pseudomonas* spp. entre os sistemas durante o período em estudo (Anova,  $P < 0,05$ ;  $F= 1,74$ ) (Figura 9C).

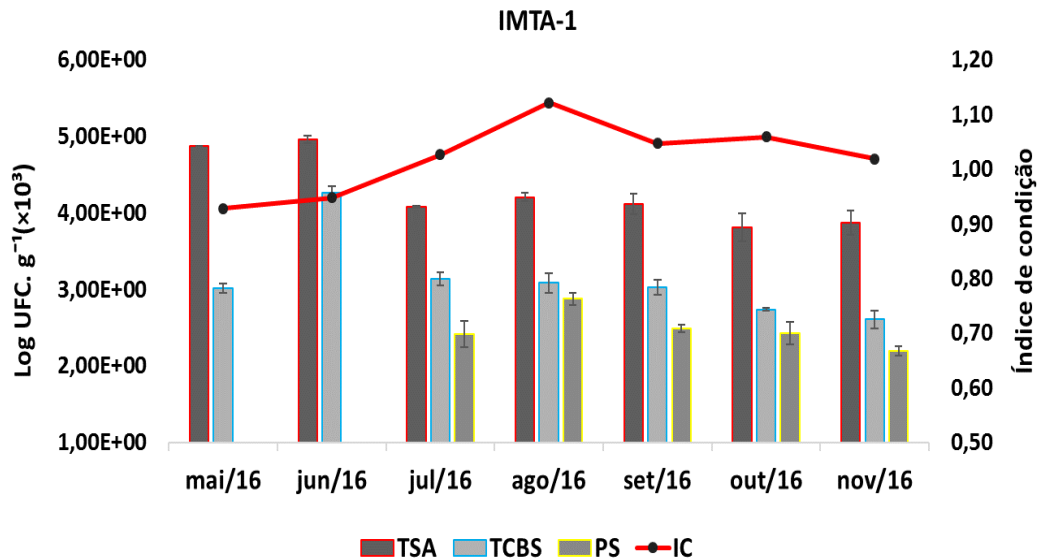


**Figura 9-** Variação dos teores de bactérias marinhas totais (A), *Vibrionaceae* (B), e *Pseudomonas* spp. (C) ao longo do período de amostragem nos três sistemas IMTA: IMTA-1: Peixes + ostras + algas; IMTA-2: Peixes + ostras e IMTA-3: Peixes + macroalgas.

### 3.3. Relação entre os parâmetros microbiológicos, parâmetros físico-químicos da água e índice de condição.

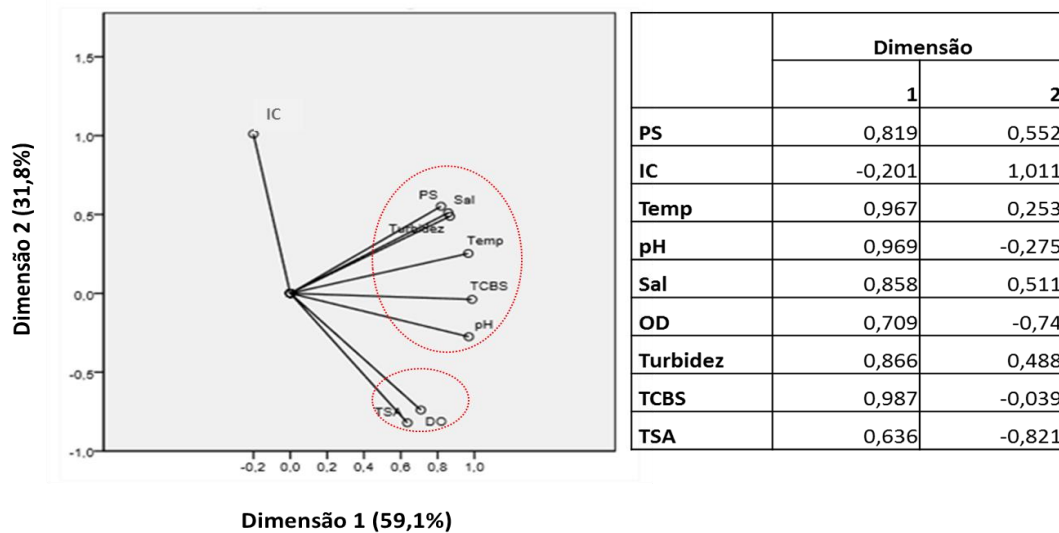
Na figura 10, observa-se que os valores médios das bactérias marinhas totais ao longo do período de amostragem apresentaram-se ligeiramente estáveis, estando em torno de  $3.1 \times 10^4$  ufc's.  $g^{-1}$ , com valores mais altos em maio e junho, em comparação com os valores médios de *vibrionacea* que foram  $3.4 \times 10^3$  ufc's. $g^{-1}$ , verificando-se um aumento ligeiro no mês de junho com a subida da temperatura, estabilizando-se a seguir nos meses subsequentes, com relação a *Pseudomonas*, não se observou crescimento de

colônias viáveis em maio e junho, e as ufc's permaneceram em volta  $2.2 \times 10^2$  ufc's.g<sup>-1</sup>. Ao longo do período de amostragem, foi possível verificar que o índice de condição apresentou o pico mais alto no mês de agosto, sendo os valores observados aceitável para a espécie maior >1.



**Figura 10-** Relação entre os parâmetros microbiológicos e o índice de condição das corvinas (*Argyrosomus regius*) no IMTA-1: Peixes + ostras + macroalgas. (TSA: Bactérias marinhas totais, TCBS: *Vibrionaceae*, PS: *Pseudomonas* spp., IC- índice de condição).

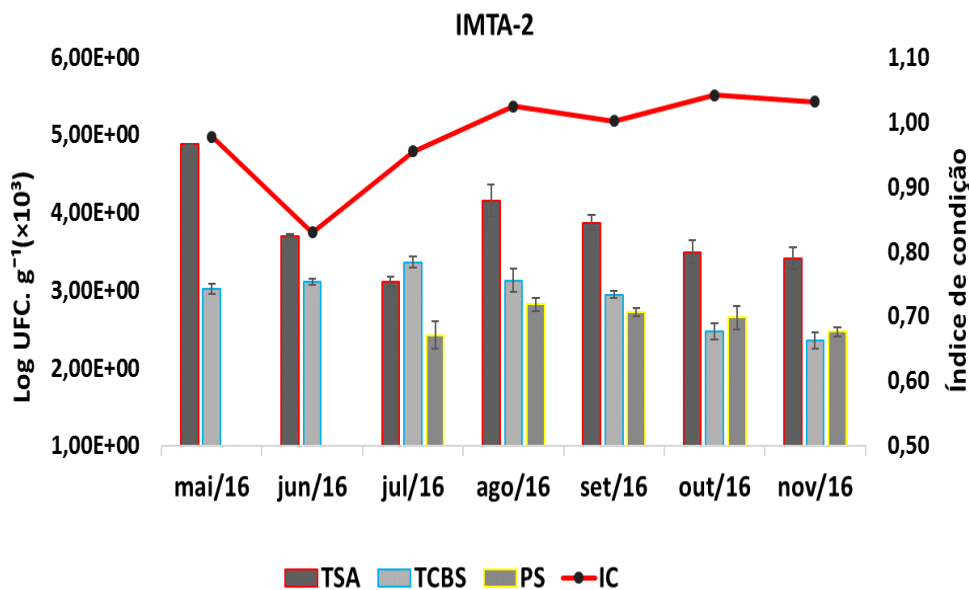
Analisando de forma global, a análise de componentes principais (PCA), explicou 90,4% da variabilidade total dos dados, estando 59,6 % explicado pela dimensão 1 e 31,8 % explicada pela dimensão 2. Tanto a dimensão 1 ( $\alpha = 0,93$ ) e a dimensão 2 ( $\alpha = 0,77$ ), apresentaram uma consistência interna satisfatória. Com relação a dimensão 1, verificou-se que os parâmetros físico-químicos com os valores, mais elevados foram a temperatura e o pH, já os microbiológicos foram os TCBS (*Vibrionaceae*) e PS (*Pseudomonas* spp.), na dimensão 2 o índice com maior valor foi o IC (Figura 11).



**Figura 11** - Representação gráfica da análise de componentes principais para a verificação da relação entre os parâmetros físico-químicos, microbiológicos e índice de condição das corvinas (*Argyrosomus regius*) no IMTA-1: Peixes + ostras + macroalgas. (TSA: Bactérias marinhas totais, TCBS: *Vibrionaceae*, PS: *Pseudomonas* spp., IC- índice de condição).

Entretanto, pode-se verificar que o IC não foi influenciado por outras variáveis, no entanto, inversamente correlacionada com o teor de bactérias marinhas totais (TSA) que foi influenciado pelo nível de oxigênio dissolvido. Contrariamente, a PS (*Pseudomonas* spp.), TCBS (*Vibrionaceae*), temperatura, salinidade, pH e a turbidez estiveram fortemente relacionadas formando um único grupo.

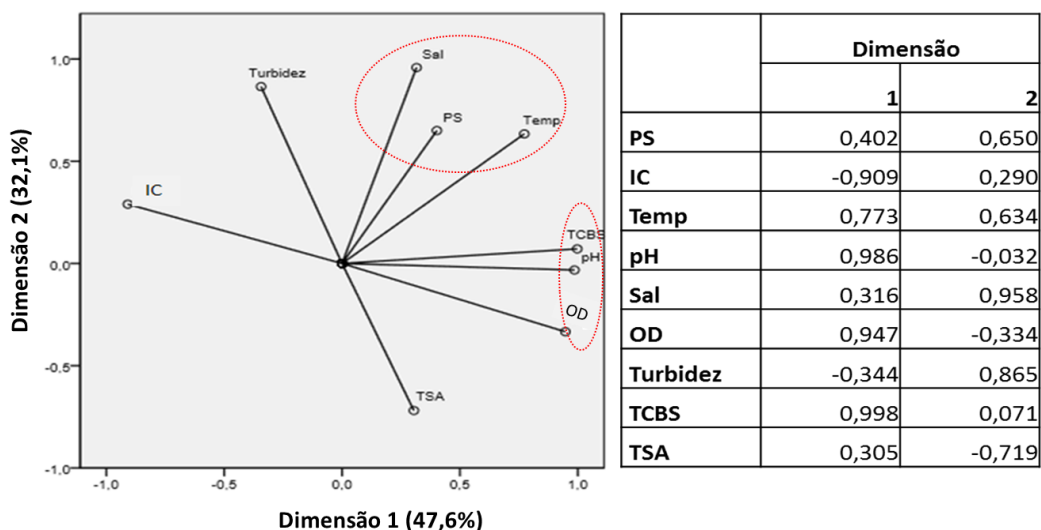
Na figura 12, observou-se a ocorrência de variação no número de bactérias marinhas totais nos primeiros meses de amostragem, havendo uma descida das mesmas de junho a julho, voltando a subir em agosto, comportamento observado também no índice de condição dos peixes, os valores médios estiveram em torno de  $1.5 \times 10^4$  ufc's.g<sup>-1</sup>, no que concerne as percentagens de *vibrionacea* foram mais altas de junho a agosto, com média em volta de  $1.0 \times 10^3$  ufc's.g<sup>-1</sup>, foi observado também a ausência de crescimento colonias viáveis no meio pseudomonas em maio e junho, exibindo o pico mais alto em agosto, os valores médios foram de  $3.1 \times 10^2$  ufc's.g<sup>-1</sup>.



**Figura 12** - Relação entre os parâmetros microbiológicos e o índice de condição das corvinas (*Argyrosomus regius*) no IMTA-2: Peixes + ostras. (TSA: Bactérias marinhas totais, TCBS: *Vibrionaceae*, PS: *Pseudomonas* spp., IC- índice de condição).

Observando a distribuição das variáveis, através da análise de PCA identificou-se que algumas encontra-se muitas dispersas umas das outras e que os parâmetros que mais influíram na distribuição das bactérias neste caso foram o pH e oxigênio dissolvido. O modelo explicou 79,7% da variância total, sendo 47,6% explicado pela dimensão 1 e 32,1 explicado pela dimensão 2. A consistência interna da dimensão 1 é de  $\alpha = 0,88$  e da dimensão 2 é de  $\alpha = 0,77$  ambas consideradas satisfatórias, na dimensão 1 as variáveis com os valores mais altos foram, parâmetros físico-químicos (pH e oxigênio dissolvido) e microbiológicos (TCBS – *Vibrionaceae*), já na dimensão 2 as variáveis com os valores mais altos foram a salinidade e turbidez, e os microbiológicos foi o PS (*Pseudomonas* spp.) (Figura 13).

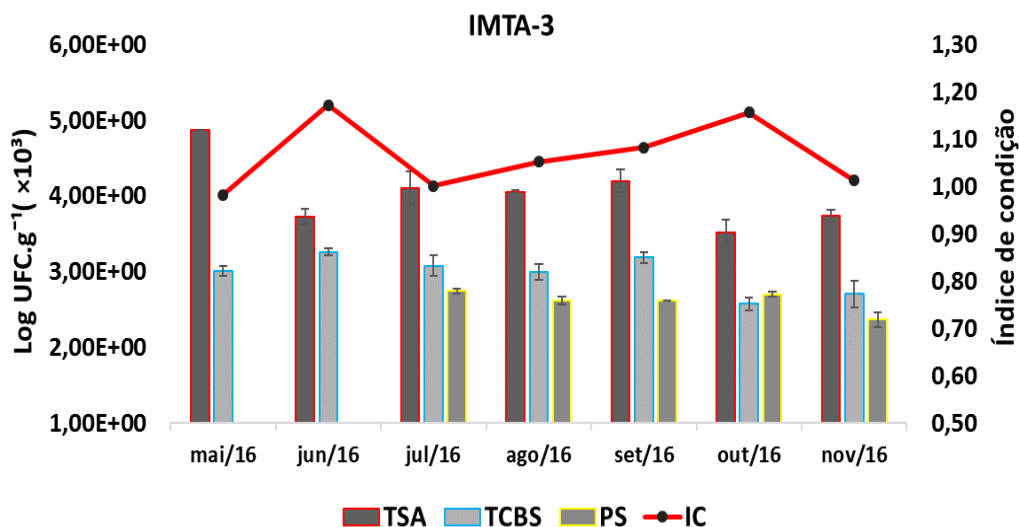
..



**Figura 13** - Representação gráfica da análise de componentes principais para a verificação da relação entre os parâmetros físico-químicos, microbiológicos e índice de condição das corvinas (*Argyrosomus regius*) no IMTA-2: Peixes + ostras. (TSA: Bactérias marinhas totais, TCBS: *Vibrionaceae* e PS: *Pseudomonas* spp., IC- índice de condição).

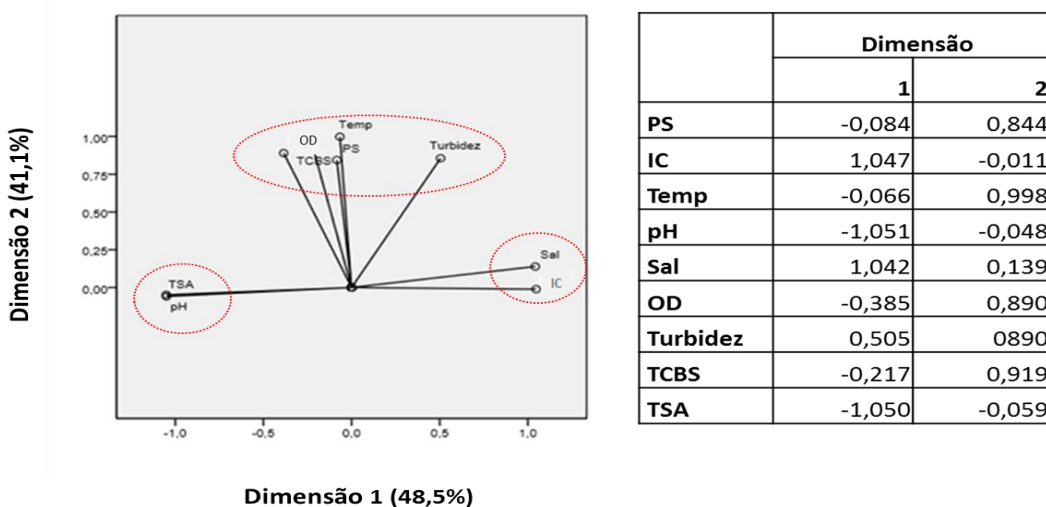
De um modo geral, verifica-se que o IC não foi influenciado por outras variáveis, enquanto que o teor de bactérias marinhas totais (TSA) esteve inversamente relacionada aos níveis de turbidez, ao contrario, das outras variáveis formaram dois grupos, sendo, a salinidade, PS (*Pseudomonas* spp.) e temperatura muito próximas, seguidas pelas (TCBS - *Vibrionaceae*), oxigénio dissolvido e pH, igualmente.

Na figura 14, as bactérias marinhas totais exibiram valores médios de  $2.0 \times 10^4$  ufc's.g<sup>-1</sup>, estando mais ou menos estáveis e altos no período de julho a setembro, quanto às *Vibrionacea* e *Pseudomonas* apresentaram valores muito próximos ao do período de amostragem, com valores médios em torno de  $1.0 \times 10^3$  e  $3.0 \times 10^2$  ufc's.g<sup>-1</sup>, respectivamente, com um pequeno incremento no mês de junho para *vibrionacea* e nenhum crescimento em maio e julho para as *Pseudomonas*. Diferente do IMTA-1 e IMTA-2, o índice de condição no IMTA-3 apresentou dois picos nos meses de junho e outubro, e uma descida mês de julho.



**Figura 14-** Relação entre os parâmetros microbiológicos e o índice de condição das corvinas (*Argyrosomus regius*) no IMTA-3: Peixes + macroalgas. (TSA: Bactérias marinhas totais, TCBS: *Vibrionaceae*, PS: *Pseudomonas* spp., IC- índice de condição).

Da análise de componentes principais (PCA), observou-se que o modelo explicou 89,6% da variância da total, onde 48,5% é explicada pela dimensão 1 e 41,0% pela dimensão 2. Ambas apresentam consistências internas satisfatórias com valores de  $\alpha = 0,89$  e  $0,85$ , respectivamente. Sobre a dimensão 1, as variáveis mais significativas foram a salinidade, turbidez e IC, a variável temperatura foi a que apresentou maior peso na dimensão 2. (Figura 15)



**Figura 15 -** Representação gráfica da análise de componentes principais para a verificação da relação entre os parâmetros físico-químicos, microbiológicos e índice de condição das corvinas (*Argyrosomus regius*) no no IMTA-3: Peixes + macroalgas. TSA: Bactérias marinhas totais, TCBS: *Vibrionaceae*, e PS: *Pseudomonas* spp., IC- índice de condição).

De um modo geral, verifica-se que o IC e a salinidade, estiveram diametralmente opostas com o teor de bactérias marinhas totais (TSA) e o pH. Contrariamente, o oxigénio dissolvido, TCBS (*Vibrionaceae*), PS (*Pseudomonas* spp.), temperatura e a turbidez estiveram muito relacionados formaram um único grupo.

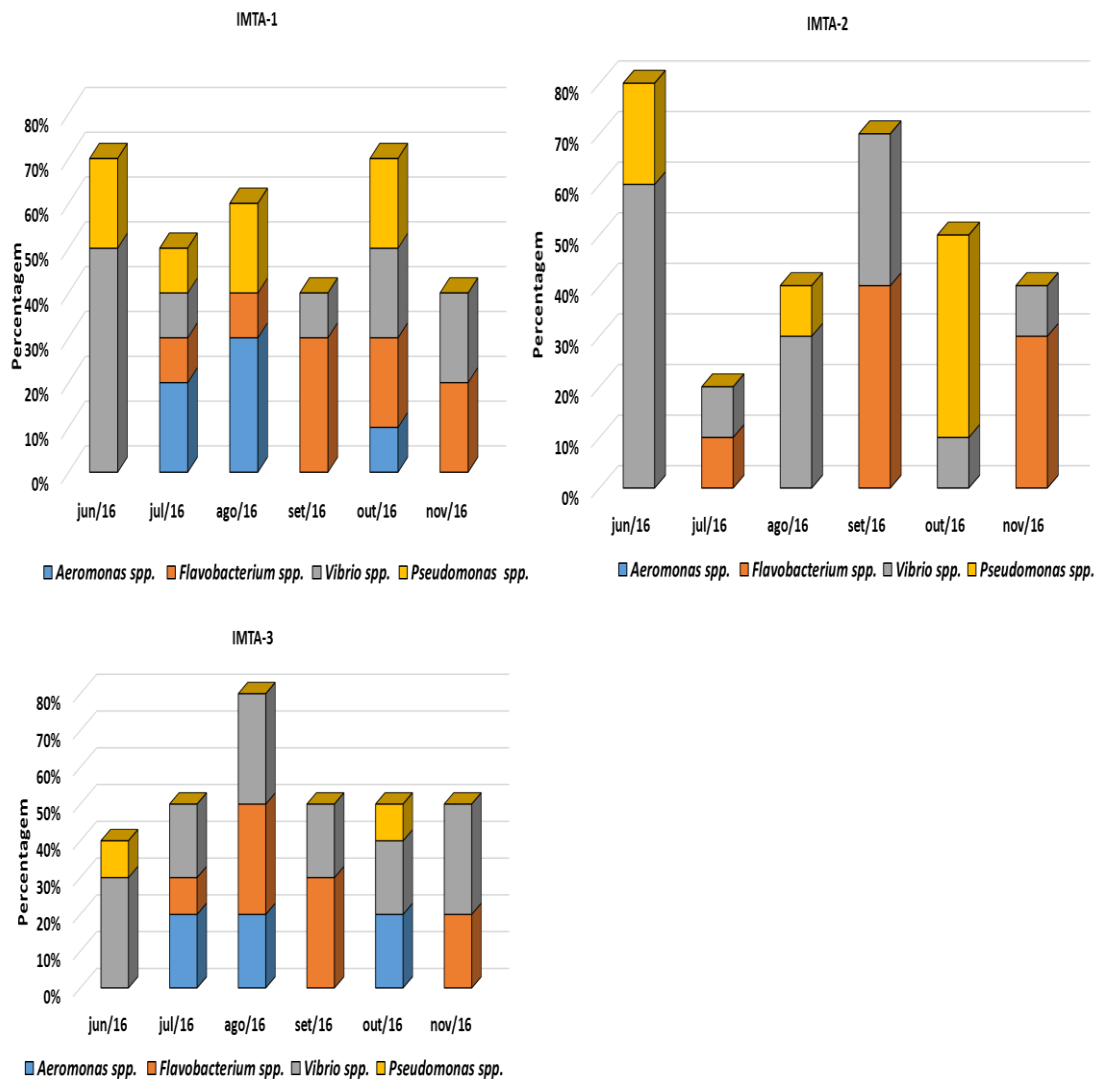
### 3.4. Caracterização da comunidade bacteriana

A identificação bacteriológica do muco da pele de corvinas produzidas nos diferentes sistemas IMTA dos tanques de terra existentes na EPPO, mostrou que a comunidade bacteriana é formada maioritariamente por bactérias dos géneros *Vibrio* spp., *Pseudomonas* spp., *Flavobacterium* spp. e *Aeromonas* spp. De um modo geral observou-se que em todos os IMTA houve interferência na colonização bacteriana ao longo do período de amostragem, exceto nos meses de julho, setembro e novembro.

Em relação à distribuição dos géneros bacterianos para cada mês no IMTA-1, constatou-se que não houve uma uniformidade na distribuição dos mesmos. Relativamente à abundância, o género mais representativo foi o *Vibrio* spp., estando presente em quase todos os meses, com uma maior ocorrência no mês de junho (50%), para além do género *Pseudomonas* spp. (20%). Nos meses de julho e outubro, verificou-se a presença de todos os géneros identificados, diferente de setembro e novembro que foi dominante pelos géneros *Flavobacterium* spp. na ordem de 30% e *Vibrio* spp. com 20%, respectivamente.

Relativamente ao IMTA-2, o género com maior representatividade foi *Vibrio* spp., seguido por *Flavobacterium* spp. e *Pseudomonas* spp., e não se verificou a ocorrência de *Aeromonas* spp. Em termos de colonização, nos meses de junho, agosto e outubro verificou-se somente a ocorrência de bactérias dos géneros *Pseudomonas* spp. e *Vibrio* spp, sendo os meses de junho (60%) e agosto (30%) dominados pelo género *Vibrio* spp. e outubro por *Pseudomonas* spp. (40%), em contraste, com os meses de julho, setembro e novembro nos quais a ocorrência predominante foi os géneros *Flavobacterium* spp e *Vibrio* spp., sendo o mês de setembro com a maior ocorrência *Flavobacterium* spp.(40%) e *Vibrio* spp. (30%), por conseguinte, o mês de julho foi o que apresentou a menor ocorrência na ordem de 10%.

No IMTA-3, não se verificou semelhança na distribuição dos gêneros ao longo de período de amostragem. Os gêneros mais representativos foram *Vibrio* spp. ocorrendo em todos os meses e *Flavobacterium* spp. que não ocorreram em julho e agosto. Os meses de julho, agosto e outubro foram os que apresentaram maior representatividade bacteriana, conotando uma maior interferência na colonização nestes meses, com exceção aos meses de junho, setembro e novembro. Observou-se a também a presença de *Pseudomonas* spp. em junho e outubro na disposição de 10%, e *Aeromonas* spp. em julho, agosto e outubro na ordem de 20%. Relativamente à colonização no mês de novembro, o gênero mais abundante no muco da pele de corvinas foi *Vibrio* spp., estando a 30% (Figura 16).



**Figura 16-** Abundância relativa (%) dos gêneros bacterianos identificados nos três sistemas de cultivo IMTA, IMTA-1: Peixes + ostras + macroalgas; IMTA-2: Peixes + ostras e IMTA-3: Peixes + macroalgas, ao longo do período de amostragem.

## 4. DISCUSSÃO

Com este trabalho, pretendeu-se caracterizar a comunidade bacteriana do muco da pele de corvinas produzidas em diferentes sistemas IMTA, bem como, a influência dos parâmetros físico-químicos da água na colonização e distribuição das mesmas ao longo de período de estudo. Segundo Dionísio *et al.*, (2000), o ambiente marinho, através da sua auto capacidade de renovação, permite-lhe estabelecer o seu próprio equilíbrio, diferente dos sistemas semifechados como é caso da Ria Formosa essa capacidade pode ser fortemente influenciada por vários factores externos. As populações bacterianas, estão fortemente correlacionadas com o meio ambiente, uma vez que apresentam um ciclo de vida muito curto, as condições ambientais adversas podem-se refletir rapidamente no tipo e quantidade de bactérias presentes (Dionísio, 1996).

### 4.1. Parâmetros físico-químicos

A temperatura é um dos principais parâmetros ambientais, que atua no controlo populacional no meio aquático, condicionando a influência de outros parâmetros físico-químicos, bem como, o controlo do crescimento e reprodução dos organismos (Dionísio, 1996; Body, 1999), porém, o resultado da temperatura no ambiente marinho natural, não se determina isoladamente, sendo possível apenas quando se conhece os outros factores envolvidos (Rheinheimer, 1992). O aumento da temperatura pode despoletar o aumento da concentração bacteriana, que posteriormente desencadeia o aumento do consumo de oxigénio (Melo, *et al.*, 1990).

Os valores médios de temperatura registados neste estudo, máxima 28°C (agosto) e mínima 17°C (novembro), vão de acordo aos obtidos por outros autores que realizaram estudos no sistema lagunar da Ria Formosa, tais como: Brito *et al.*, (2010); Chicharo *et al.*, (2012); Cabaço & Santos, (2014) e Martínez-Cegro *et al.*, (2014). Estas variações segundo Calvario (1995), podem ser explicadas pela acção das temperaturas atmosféricas que variam ao longo do ano.

Relativamente ao pH, o ambiente marinho exhibe um pH que varia em torno de 7,5 e 8,5, podendo ser influenciado por vários factores tais como, nível de oxigénio dissolvido,

temperatura, actividades fotossintéticas e pressão, de acordo com Rozen & Belkin, (2001). As bactérias geralmente crescem melhor numa faixa de pH próxima da neutralidade (6,5 e 7,5), existindo poucas que crescem em meios ácidos em torno de 4, e outras muitíssimas tolerantes às condições ácidas (Pelczar *et al.*, 1993).

Os valores médios registados de pH nos três sistemas IMTA (8,2 e 8,6), são similares aos de outros estudos na Ria formosa, como por exemplo Branco, (2003); Chícharo *et al.*, (2012); com valores médios que rondavam (8,0 e 8,8). Lima (1992) e Gamito (1994), reportaram em tanques de cultivo no estuário do Sado e lagoas na zona costeira da Ria formosa, valores médios de pH em volta de 8,4. Estando todos em conformidade com os valores padrão para águas dos oceanos (Isnansetyo *et al.*, 2014), podendo ser considerado um factor menos importante na variação das bactérias devido as pequenas variações observadas (Tortora *et al.*, 2000).

Segundo Dionísio *et al.*, (2000) a salinidade é um parâmetro que delimita a distribuição dos organismos marinhos. A maioria das bactérias marinhas são halófilas, crescendo melhor em concentrações de 2,5 a 4,0% de NaCl (Pelczar *et al.*, 1993), uma vez, que elas necessitam de grande concentração de ião sódio para manter a integridade membranar (Prescott *et al.*, 1996). A salinidade exerce grande pressão sobre a velocidade de crescimento, fisiologia e reprodução da microbiota (De Oliveira, 1990).

Os valores médios de salinidade observados (entre 33,55 e 36,54 psu), nos três IMTA durante o período de amostragem, são semelhantes aos apresentados por outros autores para esta área. Barbosa (1989), Newton & Mudge (2003), Chícharo *et al.*, (2012), observaram valores que rondavam entre 30,80 e 35,19 psu; já Dionísio *et al.*, (2000) durante um período de 2 anos de amostragem, obteve valores que oscilaram entre 25 e 37 psu.

Relativamente às ligeiras variações observadas no período de setembro até novembro, pode estar associado à ocorrência de precipitação, bem como à dinâmica entre a evaporação e precipitação, uma vez que, geralmente os níveis mais altos são observados no verão e baixos no inverno. (Jeyageetha *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2016; Velez *et al.*, 2016). Dionísio *et al.*, (2000).

O teor de oxigénio dissolvido no habitat marinho, pode ser considerado como um dos fatores primordiais, que determinam a sobrevivência e abundância dos organismos. É influenciado principalmente pela variação da temperatura e salinidade, visto que, a sua capacidade de dissolução, diminui com a medida que a temperatura e salinidade aumenta. Em águas com baixos teores em oxigénio, pequenas alterações podem desencadear importantes modificações na população bacteriana (Rheinheimer, 1992; Peixoto, 2008; Kaiser *et al.*, 2011, Miller & Wheeler, 2016).

Relativamente, aos valores médios de oxigénio dissolvido obtidos ao longo do período de amostragem (5,24 e 6,95 m/L), pode-se afirmar que estão próximos dos obtidos por Dionísio (1996), no qual para a mesma época de estudo os valores oscilaram entre 5,95 e 7,93 mg/L, bem como, Branco (2003), com valores oscilando entre 6,4 a 7,5 mg/L. Os níveis de oxigénio dissolvido oscilaram em função a variação da temperatura, diminuindo com o aumento da mesma. Condição que pode estar relacionada com o aumento da abundância de organismos fotossintéticos e uma actividade bacteriana maior ligada a decomposição da matéria orgânica no sedimento, por causa das altas temperaturas o que leva a um maior consumo de oxigénio (Kaiser *et al.*, 2011; Miller & Wheeler, 2016).

No que diz respeito à turbidez, é um dos parâmetros que influencia grandemente a dinâmica das bactérias no meio aquático, sendo resultado de altas concentrações de matéria em suspensão na água, de origem orgânica ou mineral. Assim, quanto maior a concentração de partículas de natureza orgânica ou inorgânica, maior a turbidez (Rheinheimer, 1992).

Ao longo do período de estudo, verificou-se que entre os parâmetros analisados este foi um dos que mais variou, principalmente nos meses mais quentes. Esta condição pode estar associada ao facto de que o aumento da temperatura pode ocasionar o aumento da concentração da matéria orgânica (preveniente da ração não consumida e excretada), e conseqüentemente o aumento da carga bacteriana, uma vez que, encontram neste material, alimentação e substrato. De acordo com Constantin *et al.*, (2016) e Suominen & Tolvanen, (2016), os valores de níveis de turbidez podem modificar-se ao longo de

um determinado tempo, dado que, essa variação pode ser atribuída a processos relacionados como, eutrofização, condições climáticas, ciclos sazonais, variação natural das intrusões de águas fluviais, turvas, etc.

Relativamente à diferença entre os valores médios observados nos 3 sistemas IMTA, os altos valores de turbidez registados no IMTA-3 (Peixes + Algas), pode estar associado a alta concentração de microalgas, que são grande parte das partículas orgânicas que causam turbidez, bem como a presença de macroalgas. De acordo com Troell *et al.*, (2003), as algas aproveitam a energia solar e os nutrientes disponíveis, provenientes da excreção e ração não consumida (especialmente compostos azotados, fósforo e carbono) para realizar a fotossíntese de modo a aumentar a biomassa, enquanto assimilam os nutrientes inorgânicos na água.

Por outro lado, a observação de níveis mais baixos de turbidez no IMTA-2 (Peixes + ostras), estará associada ao facto de ostras, como seres filtradores, poderem reter os microrganismos que se encontram na água (Trollope, 1984). Esta acumulação de microrganismos é influenciada por diferentes processos, como por exemplo as diferentes taxas de sobrevivência e acumulação, que dependem do processo de seleção dos microrganismos no interior dos bivalves, tendo como base de seleção, a forma, o tamanho das células bacterianas, e a sua resistência à ação das enzimas digestivas presente nos moluscos (Bettencourt *et al.*, 2012).

#### **4.2. Parâmetros microbiológicos**

Analisando de modo geral os resultados, observou-se que tanto as contagens de ufc's feitas em meio TSA, TCBS, como em meio *Pseudomonas*-CN, apresentaram um padrão de distribuição não uniforme ao longo do período de amostragem. O número de bactérias marinhas totais (TSA) compreende o teor de *Vibrionacea*, *Pseudomonas* spp., *Flavobacterium* spp e *Aeromonas* spp. por esse motivo, observaram-se valores mais altos de bactérias de marinhas totais, relativamente com os valores de *Vibrionacea* e *Pseudomonas* spp.

O número de bactérias marinhas totais obtidos em torno de  $10^3 - 10^5$  ufc.g<sup>-1</sup>, estão de acordo com Huss (1995), que afirma que a carga bacteriana na superfície da pele dos

peixes pode variar de  $10^2 - 10^7$  ufc.g<sup>-1</sup>. Segundo Kepner & Pratt (1994), a estimativa do número de bactérias totais e a sua biomassa, serve de base importante para a compreensão da função desempenhada pelos microrganismos no ambiente marinho. A variação dos valores médios das bactérias marinhas totais, nos três sistemas IMTA ao longo do período de amostragem, pode estar associado à variação dos parâmetros físico-químicos, particularmente a temperatura, aumento dos níveis de nutrientes e a renovação da água.

O teor de ufc's de *Vibrionacea*, teve uma distribuição normal ao longo dos meses de amostragem nos três sistemas IMTA. Os níveis mais altos observados nos meses mais quentes devem-se ao facto de que, o aumento excessivo da temperatura desencadear uma proliferação excessiva das mesmas (Barbosa, 1989; Diggles *et al.*, 2000; Anacleto *et al.*, 2013). O interior da Ria formosa, em termos de abundância e biomassa da comunidade bacteriana, apresenta um ciclo sazonal unimodal, com picos mais altos no verão (Barbosa, 2006).

O teor de ufc's de *Pseudomonas*, em relação aos outros teores estudados foi o que apresentou uma maior discrepância. A não ocorrência de colónias viáveis no meio Pseudomonas-CN no período de maio até junho, pode estar associada à sucessão ecológica na água devido à variação da temperatura (Yagoub, 2009).

#### **4.3. Relação entre os parâmetros microbiológicos, parâmetros físico-químicos da água e índice de condição (IC)**

No IMTA-1, através da análise das variáveis estudadas, permitiu observar que o IC não foi influenciado pelos parâmetros microbiológicos. Segundo Arts & Kohler (2009), o IC é uma ferramenta essencial para determinação do estado de saúde dos peixes, porém, é necessário determinar e avaliar outros factores envolventes. Campana *et al.*, (1996) e Kumlu *et al.*, (2000), descreveram a temperatura e a salinidade entre os diversos factores físico-químicos, como os mais importantes que controlam o desenvolvimento e o crescimento dos peixes, visto que, influenciam diretamente a taxa metabólica, fazendo como que os peixes comam mais, e subsequente aumentem de peso, estabilizando-se com a descida da temperatura, comportamento verificado no IC neste sistema, com o pico mais alto em agosto.

A relação verificada entre o teor de *Vibrionacea* e a temperatura, vai de acordo com os resultados obtidos por outros autores, Lhafi & Kühne (2007) e Ripabelli *et al.*, (1999), relativamente à ausência de relação entre o número de bactérias marinhas totais e a temperatura, segundo Dos Santos (2011), pode estar associado a abundância bacteriana da Ria formosa de onde provém a água dos tanques utilizados no ensaio.

No IMTA-2, verificou-se uma maior dispersão das variáveis estudadas, bem como a ausência de correlações significativas entre os parâmetros microbiológicos e o IC. De acordo com Younger *et al.*, (2003), estas variações resultam da influenciagem de diversos factores, atuando isoladamente ou em conjunto, compreendendo: temperatura, salinidade, oxigénio dissolvido, alterações na actividade biológica das espécies, sazonalidade das precipitações, entre outros.

O comportamento observado do IC, com a descida no mesmo no mês junho, pode estar associada ao surto do parasita dinoflagelado *Amyloodinium ocellatum*, situação que pode ocasionar a surgimento de doenças oportunistas por causa do enfraquecimento do sistema imunitário. Segundo Soares *et al.*, (2012), a ocorrência de uma doença infecciosa é normal, porém, pode se observar uma diminuição do IC de peixes doentes em comparação com IC de peixes saudáveis. As relações observadas entre *Vibrionacea*, *Pseudomonas* spp., com a temperatura, turbidez e oxigénio dissolvido, deve-se ao aumento temperatura (Begon *et al.*, 2007, Mariano-Soriano *et al.*, 2011). Associado a estes resultados, pode estar o sistema de cultivo (Peixes + ostras), as ostras alimentam-se particularmente de fitoplâncton e matéria orgânica em suspensão, incluindo microalgas, bactérias e outros, essas qualidades tornam-as dos organismos mais utilizados em culturas integradas (Martinez-Cordova & Martinez-Porchas, 2006).

No IMTA-3, registou-se ausência de relações entre os parâmetros microbiológicos com o IC tal como no IMTA-2, podendo ser justificados pelas mesmas razões. O IC ao longo do período de amostragem apresentou dois picos em junho e outubro, variações que podem estar relacionadas ao aumento da temperatura no mês de junho e a ocorrência de precipitações no mês de outubro. Segundo De Abreu (2014), a ausência de ostras neste sistema de cultivo, pode denotar a inexistência de uma predação efetiva e/ou

direcionada ao fitoplâncton, além, da existência de quantidade de nutrientes proveniente dos produtos de excreção e do alimento não consumido.

#### **4.4. Caracterização da comunidade bacteriana**

Ao longo do período de estudo, verificou-se que a comunidade bacteriana é formada maioritariamente, por bactérias dos géneros *Vibrio* spp., *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp. e *Flavobacterium* spp., resultados semelhantes foram obtidos por Dos Santos (2011).

A distribuição desigual dos géneros bacterianos ao longo do período de estudo, entre os três sistemas de cultivo integrado IMTA, poderá estar relacionada com a comunidade biológica que as constituem e com a dinâmica em si do ecossistema, visto que, a água utilizada nos tanques de cultivo é proveniente da Ria Formosa e não passa a nenhum sistema de tratamento. Segundo Cahill (1990), as bactérias ligadas à superfície dos peixes aparentam refletir a comunidade de bactérias da água em que vivem.

Neste estudo, esperava-se que o número de bactérias fosse mais baixo no IMTA-1, pelo facto de albergar o maior número de nichos ecológicos. No entanto, o IMTA- 2 foi o que apresentou os números mais baixos, bem como, a não ocorrência de bactérias do género *Aeromonas* spp., este resultado poderia ser explicado pelo facto de que, as ostras apresentarem um alto poder de filtração da matéria orgânica e serem altamente seletivas com algumas bactérias (Christo, 2006).

O género *Vibrio* spp. foi o mais abundante, comparativamente aos outros. *Vibrio* são as principais bactérias que colonizam o muco dos peixes marinhos, comumente encontrados em ambientes marinhos e estuarinos, podendo causar doenças a peixes e outros organismos aquáticos (Diggles *et al.*, 2000). A sua abundância é condicionada pela variação da temperatura (Snoussi *et al.*, 2006). De acordo com Cahill (1990) as bactérias dos géneros *Vibrio*, *Pseudomonas* e *Aeromonas*, fazem parte do grupo das bactérias patogénicas, sendo, no entanto, comum isolá-las em peixes saudáveis, que em condições de desequilíbrio do sistema imunitário dos peixes, podem induzir a ocorrência de patologias, já que algumas delas são patógenos primários (Farkas, 1985).

## DISCUSSÃO

As variações na constituição e densidade da microbiota bacteriana, bem como dos parâmetros físico-químicos influenciaram na dinâmica dos ecossistemas aquáticos. Segundo Rebouças (2010), dentro dos sistemas aquáticos, os parâmetros físico-químicos desempenham importante função na distribuição das bactérias. Desta forma, os parâmetros microbiológicos da água de um sistema de cultivo, são essências na manutenção da saúde dos organismos.

## 5. CONCLUSÃO

- ✚ De um modo geral, ao longo do período de estudo foi possível perceber que os valores médios registados dos parâmetros físico-químicos da água, foram semelhantes aos descritos por outros autores que fizeram estudos na laguna da Ria formosa;
- ✚ Foi possível aferir que a variação dos parâmetros microbiológicos, esteve estreitamente relacionada com os parâmetros físico-químicos da água;
- ✚ Dentre os parâmetros físico-químicos da água determinados, a temperatura foi a que mais influenciou na variação dos outros parâmetros;
- ✚ Globalmente, observou-se que em todos os sistemas IMTA, houve interferência da variação dos parâmetros físico-químicos da água na colonização bacteriana ao longo do período de estudo, com exceção dos meses de julho, setembro e novembro;
- ✚ Nos três sistemas IMTA estudados, observou-se que a comunidade bacteriana associada ao muco da pele das corvinas produzidas, era formada maioritariamente por bactérias dos géneros: *Vibrios* spp., *Pseudomonas* spp., *Flavobacterium* spp. e *Aeromonas* spp.;
- ✚ Foi possível verificar que a presença ou ausência de ostras ou macroalgas, nestes sistemas de cultivo, pode ser importante na colonização bacteriana;
- ✚ O IMTA-2, comparativamente aos outros sistemas, foi o que exibiu os valores mais baixos de colonização bacteriana no muco (20% a 80%), este facto, pode estar associada a alta capacidade de filtração e seletividade na absorção de algumas bactérias;
- ✚ Relativamente aos parâmetros de crescimento, podemos concluir que os peixes produzidos nos três sistemas de cultivo IMTA, apresentaram índices considerados normais para à espécie.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Austin, B. & Mcintosh, D. (1988). *Natural antibacterial compounds on the surface of rainbow trout*. Journal of Fish Diseases, 11:275-277p.

Alexander, J. B. & Ingram., G. A. (1992). *Noncellular nonspecific defence mechanism of fish*. Annual Review Fish Diseases, incorporated into aquaculture 2:249-279p.

Apun, K. A.; Yusof, A. M.; Jugang, K. A. (1999). *Distribution of bacteria in tropical freshwater fish and ponds*. International Journal of Environmental Health Research, 9:285–292p.

Austin, B. & Zhang, X. H. (2006). *Vibrio harveyi: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates*. Letters in applied microbiology, 43:119-24p.

Arts, M. T. & Kohler, C. C. (2009). *Health and Condition in fish, the influence of lipids on membrane competency and immune response*. In: Lipids in aquatic Ecosystems. Springer, 237:256p.

Aguirre-Guzmán, G.; Lara-Flores, M.; Sánchez-Martínez, J. G.; Campa-Córdova, A. I.; Luna-González, A. (2012). *The use of probiotics in aquatic organisms. A review*. African Journal of Microbiology, Research 6:4845- 4857p.

Anacleto, P.; Sónia, P.; Nunes, M. L.; Rosa, R.; Marques, A. (2013). *Microbiological composition of native and exotic clams from Tagus estuary: Effect of season and environmental parameters*. Marine Pollution Bulletin, 74:116 -124p.

Barbosa, A. M. B. (1989). *Variação espaço temporal da abundância e biomassas bacterianas no sistema lagunar Ria Formosa*. Relatório de Estágio do curso de Licenciatura em Biologia Marinha e Pescas, Universidade do Algarve, Faro, 95 p.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Balebona, M. C. (1994). *Caracterización y mecanismos de virulencia de cepas del género Vibrio aisladas de patologías de doradas (Sparus aurata, L.) cultivadas*. Ph.D. thesis. University of Malaga, Malaga, Spain.

Branco, M. A. C. (2003). *Estudo da Produção de Linguado (Solea senegalensis KAUP, 1858) Em Tanques de Terra*. Trabalho apresentado ao IPIMAR no âmbito das Provas Públicas de acesso à Categoria de Investigador auxiliar da Carreira de Investigação Científica, 63-68p.

Barbosa, A. (2006). *Estrutura e dinâmica da teia alimentar microbiana na Ria Formosa*. Tese de Doutoramento do ramo de Ciências do Mar, especialização em Oceanografia pela Universidade do Algarve.

Balcazar, J. L.; Vendrel, D.; De Blas, I.; Ruiz-Zarzuela, I.; Girones, O.; Muzquiz, J. L. (2007). *In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens*. Veterinary Microbiology, 122:373-380p.

Barrington, K.; Chopin, T.; Robinson, S. (2009). *Integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine temperate waters*. In D. Soto (Ed.) Integrated Mariculture: A Global Review. FAO Fisheries and Aquaculture, Rome, Italy, 529:7- 46p.

Bernadsky, G & Rosenberg, E. (1992). *Drag-reducing properties of bacteria from the skin mucus of the Cornetfish (Fistularia commersonii)*. Microbial Ecology, 24: 63–76p.

Begon, M.; & Townsend, C. R.; Harper, J. L. (2007). *Ecologia: de Indivíduos a Ecossistemas*. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 740 - 752 p.

Bettencourt, F.; Matias, D.; Soares, F. (2012). *Microbiological monitoring of bivalve molluscs growing areas: a food safety and public health approach*. Aquaculture Europe, 37:11-15p.

Benhamed, S.; Guardiola, F. A.; Mars, M.; Esteban, M. A. (2014). *Pathogen bacteria adhesion to skin mucus of fishes*, Veterinary Microbiology, 171:1-12p.

Brito, A.; Newton, A.; Tett, P.; Fernandes, T. F. (2010). *Sediment–water interactions in a coastal shallow lagoon, Ria Formosa (Portugal): implications within the Water Framework Directive*. *Journal of Environmental*, 12:318–328p.

Buller, N. B. (2004). *Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual*. Cambridge: CAB-Publishing, 361p.

Cahill, M. M. (1990). *Bacterial Flora of Fishes: A Review*. *Microbial Ecology*, 19:21-41p.

Calvário, J. R. O. C. (1995). *Estrutura e dinâmica das comunidades macrobênticas da Ria Formosa (Ria Faro-Olhão)*. Tese de Doutoramento apresentada à Universidade do Algarve para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas na especialidade de Ecologia Marinha. Algarve, 337p.

Campana, S. E.; Mohn, R. K.; Smith, S. J. (1996.) *Reply: spatial implications of a temperature-based growth model for Atlantic cod (Gadus morhua) off the eastern coast of Canada*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53:2912-2914p.

Cabaço, S. & Santos, R. (2014). *Human-induced changes of the seagrass Cymodocea nodosa in Ria Formosa lagoon (Southern Portugal) after a decade*. *Cahiers de Biologie Marine*, 55:101–10p.

Christo, S. (2006). *Biologia Reprodutiva e Ecologia de Ostras do Gênero Crassostrea Sacco, 1897 Na Baía de Guaratuba (Paraná – Brasil)*. Tese apresentada à Universidade Federal do Paraná para obtenção do grau de Doutor em Ciência Biológica – Zoologia. Curitiba: Universidade Federal do Paraná.

Chícharo, M. A.; Amaral, A.; Faria, A.; Morais, P.; Mendes, C.; Piló, D.; Ben - hamadou, R.; Chícharo, L. (2012). *Are tidal lagoons ecologically relevant to larval recruitment of small pelagic fish? An approach using nutritional condition and growth rate*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 12:265–279p.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chopin, T.; Robinson, S. M. C.; Troell, M.; Neori, A.; Buschmann, A. H.; Fang, J. (2008). *Multitrophic integration for sustainable marine aquaculture*. In: Jorgensen, S. E.; FATH, B. D. (Eds.), *The Encyclopedia of Ecology, Ecological Engineering*, 3:2463–2475p.
- Cone, R. A. (2009). *Barrier properties of mucus*. *Advances Drug Delivery Reviews* 61: 75- 85p.
- Cortés, M. E.; Jessika, C. B.; Ruben, D. S. (2011). *Biofilm formation, control and novel strategies for eradication*. In: Méndez-Vilas, A. (Ed.), *Science against Microbial Pathogens. Communicating Current Research and Technological Advances*, 896-905p.
- Constantin, S.; Doxaran, D.; Constantinescu, S. (2016). *Estimation of water turbidity and analysis of its spatio-temporal variability in the Danube River plume (Black Sea) using MODIS satellite data*. *Continental Shelf Research*, 112:14 -30p.
- Cunha, E. M.; Quental-Ferreira, H.; Ribeiro, L.; Moreira, M.; Soares, F.; Caetano, M.; Ferreira, P. P. (2016). *Aquacultura Multi-trófica Integrada em Tanques de Terra*. IPMA, 1- 24p.
- Denev, S.; Staykov, Y.; Moutafchieva, R.; Beev, G. (2009). *Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture*. *International Aquatic Research*, 1: 1-29p.
- De Oliveira, R. B. (1990). *Indicadores de Poluição e Taxionomia de Leveduras do Estuário do Rio Paraíba do Norte, João Pessoa – PB, Brasil*. Tese de Doctor of Science, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- Defoirdt, T.; Ruwandeepika, H. A. D.; Karunasagar, I.; Boon, N.; Bossier, P. (2016). *Quorum sensing negatively regulates chitinase in Vibrio harveyi*. *Environmental microbial reports*, 2:44-49p.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- De Abreu, T. M. L. (2014). *Ciclo zooplantónico em tanques de terra usados para a aquacultura de peixes marinhos em Sistema integrado (IMTA)*. Dissertação apresentada à universidade do Algarve para obtenção do grau de mestre em Aquacultura e Pescas, na especialidade Aquacultura, Algarve, 21-22p
- Diler, O.; Altun, S.; Calikusu, F.; Diler, A. (2000). *A study on qualitative and quantitative bacterial flora of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) living in different fish farms*. Turkey Journal Veterinary Animal Science, 24:251-259p.
- Dionísio, L. P. C (1996). *Estudo Microbiológicos da Ria Formosa. Qualidade Sanitária de Águas e Moluscos Bivalves*. Tese de Doutoramento. Universidade de Algarve, Faro, 272 p.
- Dionísio, L. P. C.; Rheinheimer, G.; Borrego, J. J. (2000). *Microbiological pollution of Ria Formosa (South of Portugal)*. Marine Pollution Bulletin, 40:186-193p.
- Diggles, B. K.; Carson, J.; Hine, P. M.; Hiekman, R. W.; Tait, M. J. (2000). *Vibrio species associated with mortalities in hatchery-reared turbot (*Colistium mudipinnis* and *brill C. guntheri*) in New Zealand*. Aquaculture Research, 2:1-12p.
- Dos Santos, C. M. L. R. (2011). *Ritmos de posturas do sargo (*Diplodus sargus*) e da safia (*Diplodus vulgaris*). Identificação da microflora associada aos ovos*. Dissertação apresentada à universidade do Algarve para de obtenção do grau de mestre em Aquacultura e Pescas, na especialidade Aquacultura, Algarve, 27- 29p.
- Farkas, J. (1985). *Filamentous Flavobacterium sp. Isolated from fish with gill diseases in cold water*. Reviews in Aquaculture, 44:1-10p.
- FAO, (2009). *“The state of world fisheries and aquaculture 2009”* (SOFIA). Fisheries and Aquaculture Department, Rome: FAO.
- FAO, (2012). *“The state of world fisheries and aquaculture 2012”* (SOFIA), Fisheries and Aquaculture Department, Rome: FAO.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FAO, (2014). “*The State of World Fisheries and Aquaculture 2014*”. (SOFIA), Fisheries and Aquaculture Department, Rome: FAO.

FAO, (2016). “*The State of World Fisheries and Aquaculture 2016*”. (SOFIA), Fisheries and Aquaculture Department, Rome: FAO.

Fernandes, J. M. O.; Kemp, G. D.; Molle, M. G.; Smith, V. J. (2002). *Anti-microbial properties of histone H2A from skin secretions of rainbow trout. Oncorhynchus mykiss*. Biochemical journal, 368:611-620p.

Fouz, B.; Devesa, S.; Grauningen, K.; Barja, J. L.; Toranzo, A. E. (1991). *Antibacterial action of the mucus of turbot. Bulletin European Association. Fish Pathologists*, 10:56-59p.

Gamito, S. (1994). *The benthic ecology of some Ria Formosa lagoons, with reference to the potential for production of the gilthead seabream (Sparus aurata L.)*. Tese de Doutoramento apresentada à Universidade do Algarve. Faro, 211p.

Gomez, G. D. & Balcazar, J. L. (2008). *A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish*. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 52:145-154p.

Ghittino, C.; Latini, M.; Agnetti, F.; Panzieri, C.; Lauro, L.; Ciappelloni, R.; Petracca, G. (2003). *Emerging pathologies in aquaculture: effects on production and food safety*. Veterinary Research Communications, 27:471-479p.

Hacker, J. (1992). *Role of fimbrial adhesins in the pathogenesis of Escherichia coli infections*. Canadian Journal of Microbiology, 38:720-727p.

Hoepelman, A. I. M. & Tuomanen, E. I. (1992). *Consequences of microbial attachment: directing host cell functions with adhesins*. Infection and Immunity, 60: 1729-1733p.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Holt, J. G.; Krieg, N. R.; Sneath, P. H. A. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9 ed. Maryland: Williams e Wilkins.

Huss, H. (1995). *Quality and quality changes in fresh fish*. Rome: Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO), 195p.

Hughes, A. D.; Corner, A. R.; Cocch, M.; Alexander, K. A.; Freeman, S.; Angel, D.; Chiantore, M.; Gunning, D.; Maguire, J.; Beltran, A. M.; Cocchi, J. M.; Corner, R.; Hughes, A. (2016). *Beyond Fish Monoculture Developing Integrated Multi-trophic Aquaculture in Europe*. ETA-Florence Renewable Energies srl. Italy, 9-43p.

Isnansetyo, A.; Getsu, S.; Seguchi, M.; Koriyama, M. (2014). *Independent Effects of Temperature, Salinity, Ammonium Concentration and pH on Nitrification Rate of the Ariake Seawater Above Mud Sediment*. Hayati. Journal of Bioscience, 21:21-30p.

Jeyageetha, J. C.; Kumar, S. P.; Res, J. C. P. (2015). *Study of physico-chemical parameters of sea water in Tuticorin Coastal area and assessing their Quality, Tamil Nadu, Índia*. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 7:1298-1304p.

Jun, L. & Woo, N. (2003). *Pathogenicity of Vibrios in Fish: An Overview*. Journal of Ocean University of Qingdao, 2:117–128p.

Kaiser, M. J.; Attrill, M. J.; Jennings, S.; Homas, D. N.; Barnes, D. K. A.; Brierley, A. S.; Hiddink, J. G.; Kaartokallio, N. V. C. P.; Raffaelli, D. G. (2011). *Marine Ecology: Processes, Systems and impacts*. Oxford, 2:501p.

Kepner, R. L. & Pratt, J. R. (1994). *Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present*. Microbiological Reviews, 58:603-615p.

Kim, H. D. & Austin, B. (2006). *Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) induced by probiotics*. Fish Shellfish Immunology, 21:13-524p.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Kumlu, M.; Eroldogan, O. T.; Aktas, M. (2000). *Effects of temperature and salinity on larval growth, survival and development of Penaeus semisulcatus*. Aquaculture, 188:167- 173p.
- Laidler, L. A.; Treasurer, J. W., Grant, A. N.; Cox, D. I. (1999). *Atypical Aeromonas salmonicida infection in wrasse (Labridae) used as cleaner fish of farmed Atlantic salmon, Salmo salar L., in Scotland*. Journal of Fish Diseases, 22:209-213p.
- Larsen, A. M. & Arias, C. R. (2014). *More Than Mucus: The Hidden world of the Fish Microbiota*. Fisheries, 39:154-154p.
- Lima, I. M. D. P. (1992). *Condições ambientais de uma aquacultura em regime extensivo no estuário do Sado*. Relatório de Estágio de Licenciatura, INIP, 150p.
- Lhafi, S. K. & Kühne, M. (2007). *Occurrence of Vibrio spp. in blue mussels (Mytilus edulis) from the German Wadden Sea*. International Journal Food Microbiology, 116:297-300p
- Magarinos, B.; Couso, N.; Noya, M.; Merino, P.; Oranzo, A. E.; Lamas, J. (2001). *Effect of temperature on the development of pasteurellosis in carrier gilthead seabream (Sparus aurata)*. Aquacultura Research, 195:17-21p.
- Mayer, L. (2003). Mucosal immunity. Pediatrics, 111:1595-1600p.
- Makridis, P.; Martins, S.; Salavouta, M.; Dionisio, L. C.; Kotoulas, G.; Magoulas, A.; Dinis, M. T. (2005). *Antimicrobial activity in bacteria isolated from Senegalese sole, Solea senegalensis, fed with natural prey*. Aquaculture Research. 36:1619-1627p.
- Martinez-Cordova, L. & Martinez-Porchas, M. (2006). Polyculture of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, giant oyster, *Crassostrea gigas* and black clam, *Chione fluctifraga* in ponds in Sonora, Mexico. Aquaculture, 258:321-326p.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Marinho-Soriano, E.; Azevedo, C. A. A.; Trigueiro, T. G.; Pereira, D. C.; Carneiro, M. A. A.; Camara, M. R. (2011). *Bioremediation of aquaculture wastewater using macroalgae and Artemia*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65:253-257p.

Martínez-Cegro, B.; Olivé, I.; Santos, R. (2014). *CO<sub>2</sub> and nutrient-driven changes across multiple levels of organization in zosteria noltii ecosystems*. *Biogeosciences Discussions*, 11:5239-5274p.

Marques, J. F. N. (2015). *Caracterização do perfil biotecnológico de Dilsea carnosa. Ensaio de cultivo em IMTA, Análise do conteúdo coloidal, Quantificação de potencial bioativo*. Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para à obtenção do grau de Mestre em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal.

Melo, M. T. D.; Saker-Sampaio, S.; Vieira, R. S. H. F. (1990). *Avaliação da poluição orgânica no estuário do Rio Ceará (Fortaleza - Ceará - Brasil)*. *Caatinga*, 207-219p.

Mellor, D. J. & Stafford, K. J. (2001). *Integrating practical, regulatory and ethical strategies for enhancing farm animal welfare*. *Australian Veterinary Journal*, 79:762-768p.

Miller, C. B. & Wheeler, P. A. (2016). *Biological Oceanography*. Wiley-Blackwell, 2:464p.

Montgomery, M. T. & Kirchman, D. L. (1994). *Induction of chitin-binding proteins during the specific attachment of the marine bacterium Vibrio harveyi to chitin*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60:4284-4288p.

Nagashima, Y.; Kikuchi, N.; Shimakura, K.; Shiomi, K. (2003). *Purification and characterization of an antibacterial factor in the skin secretion of rock fish *Sebastes schlegeli**. *Comparative Biochemistry Physiology C: Toxicology Pharmacol*, 136:63-71p.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Newton, A. & Mudge, S. M. (2003). *Temperature And Salinity Regime en a Shallow. Mesotidal Lagoon The Ria Formosa, Portugal*. Estuarine, Coastal and Shelf Science 56:1-13p.

Neori, A.; Chopin, T.; Troell, M.; Buschmann, A. H.; Kraemer, G. P.; Halling, C.; Shpigiel, M.; Yarish, C. (2004). *Integrated aquaculture: rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture*. Aquaculture, 231:361-391p.

Nikoskelainen, S.; Ouwehand, A. C.; Bylund, G.; Salminen, S.; Lilius, E. M. (2003). *Immune enhancement in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) by potential probiotic bacteria (Lactobacillus rhamnosus)*. Fish Shellfish Immunology, 15:443-452p.

Olafsen, J. A. (2001). *Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture*. Aquaculture, 200:223-247p.

Papenfort, K. & Bassler, B. L. (2016). *Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria*. Nature Reviews Microbiology, 14:576-588p.

Pelczar, M. J.; Chan, E. C. S.; Krieg, N. R. (1993). *Microbiology: Concepts and Applications*. 1st edn. McGraw-Hill Incorporation, New York, USA, 80-100p.

Peixoto, M. J. (2008). *Qualidade Biológica da Água do Rio Cávado*. Dissertação apresentada à Universidade do Porto, Faculdade de Ciências para obtenção o grau de Mestre em Hidrobiologia. Porto, 124p.

Pilcher, K. S. & Fryer, J. L. (1980). *The Viral Diseases of Fish - a Review through Diseases of Proven Viral Etiology*. Critical Reviews in Microbiology, 7:287-363p.

Prescott, L. M.; Harley, J. P.; Klein, D. A. (1996). *Microbiology*. Brown Publishers, Dubuque, 3:935p.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Rachel, F. R. & Beverly, A. D. (2003). *Enzyme production by obligate intestinal by anaerobic bacteria isolated from Oscars (Astronotus ocellatus), angelfish (Pterophyllum scalare) and southern flounder (Paralichthys lethostigma)*. *Aquaculture*, 227: 417- 426p.

Rebouças, R. A. (2010). *Monitoramento da microbiota bacteriana da água em um sistema fechado de cultivo em uma estação de piscicultura marinha*. Dissertação para obtenção de grau de mestre, submetida à coordenação do programa de pós-graduação em ciências marinhas tropicais do instituto de ciências do mar da Universidade federal do Ceará, 58p.

Rheinheimer, G. (1992). *Aquatic Microbiology*. 4th ed. John Wiley & Sons, London.

Ripabelli, G.; Sammarco, M. L.; Grasso, G. M.; Fanelli, I.; Caprioli, A.; Luzzi, I. (1999). *Occurrence of Vibrio and other pathogenic bacteria in Mytilus galloprovincialis (mussels) harvested from Adriatic Sea, Italy*. *International Journal of Food Microbiology*, 49:43-48p.

Ringo, E.; Bendiksen, H. R.; Wesmajervi, M. S.; Olsen, R. E.; Jansen, P. A.; Mikkelsen, H. (2000). *Lactic acid bacteria associated with the digestive tract of Atlantic salmon (Salmo salar L.)*. *Journal of Applied Microbiology*, 89:317-322p.

Richards, R. C.; O'neil, D. B.; Thibault, P.; Ewart, K.V. (2001). *Histone H1: an antimicrobial protein of Atlantic salmon (Salmo salar)*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 284:549-555p.

Rozen, Y. & Belkin, S. (2001). *“Survival of Enteric Bacteria in Seawater”*. *FEMS Microbiology Reviews*, 725:1-17p.

Roberts, H. E.; Palmeiro, B.; Weber, S. (2009). *Bacterial and Parasitic Diseases of Pet Fish*. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, 609-638p.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Soares, F.; Almeida, C.; Cachola, R. (2012). *Qualidade Microbiológica dos bivalves da Ria Formosa – Vinte anos de resultados*. IPMAR, 1-47p.

Snoussi, M.; Chaieb, K.; Mahmoud, R.; Bakhrouf, A. (2006). *Quantitative study, identification and antibiotics sensitivity of some Vibrionaceae associated to a marine fish hatchery*. *Annals of Microbiology*, 56:289-293p.

Suominen, T. & Tolvanen, H. (2016). *Temporal analysis of remotely sensed turbidity in a coastal archipelago*. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*, 49:188-199p.

Smith, I. J.; Eicken, H.; Mahoney, A. R.; Van Hale, R.; Gough, A. J.; Fukamachi, Y.; Jones, J. (2016). *Surface water mass composition changes captured by cores of Arctic land-fast sea ice*. *Continental Shelf Research*, 118:154-164p.

Tortora, G. J.; Funke, B. R.; Case, C. L. (2000). *Microbiologia*. 6ed. Porto Alegre, Artmed.

Toranzo, A.; Magariños, B.; Romalde, J. (2005). *A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems*. *Aquaculture*, 246:37-61p.

Trollope, D. R. (1984). *Use of molluscs to monitor bacteria in water*. In: *Microbiological Methods for Environmental Biotechnology*. Academic Press, London, 393-408p.

Troell, M.; Halling, C.; Neori, A.; Chopin, T.; Buschmann, A. H.; Kautsky, N.; Yarish, C. (2003). *Integrated mariculture: asking the right questions*. *Aquaculture* 226:69-90p.

Troell, M.; Joyce A.; Chopin, T.; Neori, A.; Buschmann, A. H.; Fang, J. G. (2009). *Ecological engineering in aquaculture - Potential for integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine offshore systems*. *Aquaculture*, 297:1-9p.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Thompson, C. C.; Thompson, F. L.; Vicente, A. C. P.; Swings, J. (2007). *Phylogenetic analysis of vibrios and related species by means of atpA gene sequences*. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 57:2480-2484p.

Velez, C.; Figueira, E.; Soares, A. M. V. M.; Freitas, R. (2016). *Combined effects of seawater acidification and salinity changes in Ruditapes philippinarum*. Aquatic Toxicology.176:141–150p.

Westerdahl, A.; Olsson, J. C.; Kjelleberg, S.; Conway, P. L. (1999). *Isolation and characterization of turbot (Scophthalmus maximus) - associated bacteria with inhibitory effects against Vibrio anguillarum*. Applied Environmental Microbiology, 57:2223-2228p.

Yagoub, S. O. (2009). *Isolation of Enterobacteriaceae and Pseudomonas spp. From Raw fish sold in fish market in Khartoum state*. Journal of Bacteriology state journal of bacteriology research, 1: 85-88p.

Younger, A. D.; Lee, R. J.; Lees, D. N. (2003). *Microbiological monitoring of bivalve mollusc harvesting areas in England and Wales – rationale and approach*. In: Villalba, A.; Reguera, B.; Romalde, J. L.; Beiras, R. (Eds.), *Molluscan Shellfish Safety. Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos da Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO*. Santiago de Compostela, Spain, 265-277p

Zhang, S. Y.; Li, G.; Wu, H. B.; Liu, X. G.; Yao, Y. H.; Tao, L.; Liu, H. (2011). *An integrated recirculating aquaculture system (RAS) for land-based fish farming: The effects on water quality and fish production*. Aquaculture Engineering, 45:93-102p.

## 7. ANEXOS

### Anexo: Preparação dos meios de cultura

#### 1. Trypticase soy agar (Meio TSA)

**Receita:** 1L de água destilada

40g de meio

10 g de NaCl

**Procedimento:** suspendeu-se tudo num litro de água destilada, aqueceu-se numa placa de térmica com agitação até o meio ficar completamente dissolvido e entrar em ebulição. Em seguida esterilizou-se em autoclave a 121 °C durante 15 minutos, e a posterior dispensou-se em placas de Petri.

#### 2. Meio TCBS (Tiosulfato-citrato-bilis-sacarose)

**Receita:** 1L de água destilada

88g de TCBS

5g de NaCl

**Procedimento:** adicionou-se 88g de meio TCBS em pó num Erlenmeyer de 2l com um litro de água destilada, agitou-se e levou-se a aquecer na placa térmica com agitação até a solução ferver. E em seguida dispensou-se em placas de petri, sem autoclavar.

#### 3. Gelose CN para Pseudomonas

**Receita:** 1L de água do mar filtrada (pH 7,2- 7,4)

48,6g de Gelose CN

10 ml de glicerol

**Procedimento:** suspendeu-se a gelose CN num litro de água do mar filtrada, adicionou-se 10 ml de glicerol, dissolveu-se completamente e levou-se esterilizar a 121°C durante 15 minutos e dispensou-se em placas de petri.

#### 4. Amilase

**Receita:** ½ L de água destilada

14g de agar nutritivo

2g de starch salubre

2,5 de NaCl

**Procedimento:** suspendeu-se tudo em ½ litro de água destilada, esterilizou-se a 121°C e dispensou-se em placas de petri.

#### 5. Aminoácidos (arginina, lisina e ornitina)

**Receita:** 100ml de água destilada

1g aminoácido

1,52 g de meio descarboxilase

**Procedimento:** adicionou-se 1ml de aa em Eppendorf e esterilizou-se durante 10 minutos

#### 6. Crescimento na presença ou ausência de sal (NaCl)

**Receita:** 500 ml de água destilada

2g de neopeptona

0,5 g de extrato de levedura

7,5 g de agar bacteriológico nº 1

**Procedimento:** suspendeu-se tudo em um Erlenmeyer com ½ litro de água destilada suplementada com NaCl (3% de sal, 5% de sal e 10 % de sal) de modo a ficar 10% ou não (0% de sal), levou-se ao micro-ondas por alguns minutos e a esterilizar a 121 °C durante 15 minutos e dispensou-se em placas de petri.

100g	→	100%	→	15g-----3%
				25g-----5%
				50g-----10%

## **7. Meio OF (Oxidação – fermentativa)**

**Receita:** 1L de água destilada

9,4g de meio

**Procedimento:** suspendeu-se 9,4g de meio num litro de água destilada, deixou-se em ebulição até a dissolução do meio, esterilizou-se a 121°C durante 15 minutos. Após a esterilização adicionou-se 1% de D- glucose e dispensou-se em tubos.

## **8. Muller- Hinton agar**

**Receita:** 1L de água destilada

33g de meio

**Procedimento:** suspendeu-se 33g num litro de água destilada, deixou-se em ebulição até a completa homogeneização do meio, esterilizou-se a 121°C durante 15 minutos, e em seguida dispensou-se em placas de petri.

## **9. Tryptone soy broth (TSB)**

**Receita:** 1L de água destilada

30g de meio

**Procedimento:** adicionou-se 30g do meio em um litro de água destilada, agitou-se lentamente até a completa dissolução, dispensou-se em tubos e esterilizou-se a 121°C durante 15 minutos.

