

UNIVERSIDADE DO PORTO
FACULDADE DE CIÊNCIAS

Impacto de uma truticultura num pequeno rio da
bacia hidrográfica do Douro



Dissertação de Mestrado em Ecologia Aplicada

Henrique Manuel da Silva Prata

Porto
2001

Ao finalizar este trabalho, gostaria de endereçar alguns agradecimentos. Assim, não posso deixar de mencionar, o orientador Prof. Dr.º José A. Sousa, pelas suas oportunas sugestões de pesquisa e atentas revisões do trabalho.

À Dr.ª Teresa Santos, pela inestimável ajuda no processamento laboratorial das amostras.

Aos meus colegas de Mestrado, pelo incentivo e companheirismo demonstrado.

À Sandra.

À minha família, pelo apoio que sempre me deram.

E, por último, mas talvez a menção mais sentida, aos meus pais, por existirem.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos Históricos	2
1.2 O Ambiente Aquático e as Bactérias	3
1.2.1 Papel das Bactérias no Meio Aquático	3
1.2.2 Presença de agentes patogénicos para o Homem	5
1.2.3 Indicadores de Eutrofização	6
1.2.3.1 Bactérias Heterotróficas Totais	6
1.2.3.2 Bactérias Ubíquas	7
1.2.3.3 Comunidades Bacterianas	9
1.2.4 Importância Ecológica das BVNC	9
1.2.5 Bactérias aderidas ao substrato	11
1.3 Doenças nos Peixes Selvagens	12
1.4 Expressão da Doença	13
1.5 Avaliação dos Riscos Microbiológicos	14
1.6 Interações entre Peixes Selvagens e Cultivados	16
1.6.1 Peixes Selvagens na Proximidade das Truticulturas	16
1.6.2 Fugas de Peixes Cultivados	16
1.7 Mudanças Ambientais e Aquacultura	17
1.7.1 Factores de Stress Ambientais	18
1.7.1.1 Químicos	18
1.7.1.2 Biológicos	19
1.8 Microrganismos Patogénicos de Peixes de Decl. Obrig.	20
1.8.1 <i>Aeromonas Salmonicida</i>	20
1.8.2 <i>Yersinia ruckeri</i>	21
2. OBJECTIVOS	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Objecto de Estudo	28
3.2 Tipos de Amostras	29
3.3 Procedimento	29
3.4 Isolamento de Bactérias	30
3.4.1 "Plate Count Agar"	30
3.4.2 "Shotts-Waltman"	31
3.5 Caracterização Fenotípica	31
4. RESULTADOS	35
5. DISCUSSÃO	56
6. CONCLUSÕES	63
7. BIBLIOGRAFIA	66
8. ANEXOS	80

RESUMO

Neste trabalho estudaram-se amostras ambientais de água e sedimento de um pequeno rio da bacia hidrográfica do Douro, no sentido de determinar o impacto de uma exploração de truticultura no meio.

Para isso, colheram-se mensalmente amostras a montante, junto à saída do efluente e a jusante (1,5 Km) da truticultura, durante o período de um ano. Nas amostras procurou-se pesquisar a comunidade bacteriana autóctone existente, e analisar as mudanças nesta, no número de bactérias e na estrutura da comunidade, resultantes da actividade de aquacultura naquele local. Procurou-se também, pesquisar bactérias patogénicas de peixes de declaração obrigatória.

Verificou-se existir um impacto limitado da truticultura no rio, uma vez que o aumento do número de bactérias e a alteração na constituição da comunidade bacteriana local registada é em parte mitigado pelas características do rio, que possui bons mecanismos de auto-depuração. Não foram encontradas bactérias patogénicas de declaração obrigatória.

Verificou-se a necessidade de um acompanhamento da actividade naquele local num prazo mais dilatado e um aumento da frequência de amostragens, de forma a poder estabelecer-se com nitidez a extensão do impacto no meio ambiente. Futuras investigações do funcionamento da truticultura deverão incluir observações da utilização de antibióticos e desinfectantes.

ABSTRACT

In this work we studied environmental samples of water and sediment from a small river of Douro's basin, with the aim of assessing the impact of a trout aquaculture in the environment.

Thus, we sampled upstream, near the effluent and downstream from the aquaculture monthly, during 1 year. In the samples we tried to look for a native bacterial community and analyse the shifts in the bacterial numbers and community structure, following aquaculture activities. We also searched for bacteria responsible for notifiable fish diseases.

We find to exist a limited impact of the trout aquaculture in the river, because the increase in the bacterial numbers and the changes in the bacterial community structure become, in part mitigate by the self-depuration properties of the river. We did not find obligatory declaration fish pathogenic bacteria. We also find a non-point bacteria source in the river.

We recommend a monitorization of the aquaculture in that place in a more distended period of time, and an increase sampling effort in the purpose to find with clearness the extent of the environmental impact. Further investigations of trout aquaculture activities in the place, should include observations of the utilization of antibiotics and disinfectants.

Capítulo 1.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Históricos

Apesar de a maior parte do planeta se encontrar coberto de água, somente uma fracção deste recurso é água doce e toda a vida depende dela. Em tempos pré-históricos o Homem concentrou-se em locais onde este recurso era abundante levando ao desenvolvimento de pequenas comunidades e mais tarde de cidades. Ao longo da História o Homem manteve um razoável conhecimento acerca da necessidade de ter a água limpa. Em Roma construíram-se aquedutos, tinham canalizações no interior das casas e sistemas dedicados para remover as águas residuais (Szewzyk *et al*, 2000).

Com a queda do Império Romano no terceiro século D.C., os padrões da água de consumo e dos sistemas de tratamento de água da Europa tiveram um forte declínio. Em meados do século IX cidades como Paris e Londres foram atingidas por epidemias recorrentes de doenças provocadas por deficiências sanitárias e excesso de população, como a cólera cujo agente causal é a bactéria *Vibrio cholerae*. Foi John Snow, um médico londrino quem primeiro provou que o agente causador da cólera é transmitido pela contaminação fecal da água. Durante o tempo de Snow a cólera era o principal “assassino” e assim continuou até ao desenvolvimento da terapia da re-hidratação oral nos anos sessenta do séc. XX; a partir dessa altura as taxas de mortalidade decresceram de 50% para somente 1% de indivíduos infectados em Inglaterra (Wills, 1996).

Apesar de as primeiras descrições de peixes doentes terem surgido no Sec. XVII, somente no começo do Sec. XX é que o campo da patologia de peixes se desenvolveu (Stephen e Iwama, 1997). A maioria dos esforços até meados do Sec. XX eram concentrados em I) a descrição dos parasitas dos peixes; II) a identificação do microrganismo em bactéria, fungo ou vírus ou III) a descrição dos tumores nos peixes (Moller e Anders, 1986).

No final dos anos 50, dois factores resultaram na intensificação das pesquisas para a compreensão das doenças dos peixes: o desejo de usar peixes como bioindicadores da poluição das águas e o aumento da importância do cultivo intensivo de peixes. Apesar do notável crescimento da nossa compreensão de como as doenças se desenvolvem num peixe, continua a haver um importante déficite no conhecimento da epidemiologia, ecologia e impactos de doenças dos peixes selvagens e dos cultivados (Stephen e Iwama, 1997).

1.2 O Ambiente Aquático e as Bactérias

1.2.1 Papel das Bactérias no Meio Aquático

As bactérias constituem uma parte importante do ecossistema aquático, e o seu papel nos processos de decomposição (Ackefords *et al*, 1994), como fonte de nutrição (Momot *et al*, 1978) e finalmente como organismos biofiltradores (Malone e Burden, 1988) tem sido reconhecido. Num ecossistema equilibrado, as bactérias desempenham um papel positivo e controlado, enquanto que um ecossistema simplificado de aquacultura com a tendência para a eficiência pode resultar em aumentos maciços nos números de bactérias que podem resultar em mortalidades frequentes (Alderman e Polglase, 1988).

Aeromonas sp. e *Pseudomonas* sp. são das mais comuns bactérias aquáticas (Rhodes e Kator, 1994) e podem ser isoladas a partir de uma variedade de materiais naturais (O'Leary, 1989). Estes dois grupos bacterianos foram comprovadamente responsáveis por mortalidades em aquacultura (Alderman e Polglase, 1988), são indicadoras da qualidade da água e podem ser relacionadas com poluição fecal (Araújo *et al*, 1989).

A água das nascentes encontra-se geralmente livre de bactérias patogénicas humanas e o número de bactérias totais é baixo (Miettinen *et al*, 1993). *Aeromonas hydrophila* é comum em águas naturais (Pathak *et al*, 1988), onde os níveis de

Aeromonas sp. podem alcançar 100 unidades formadoras de colónias por ml (Havellaar *et al.*, 1990; Rhodes e Kator, 1994).

Nos rios, os números de *Aeromonas* podem variar entre 10^2 e 10^3 /ml (Hurst *et al.*, 1997). Altas densidades populacionais aparecem ligadas à poluição fecal e à temperatura e proliferam em águas residuais domésticas e industriais. Segundo Hurst *et al.* (1997), existem evidências que sugerem que uma alta proporção de *Aeromonas* em águas ambientais, podem produzir enterotoxinas e alguns estudos sugerem também, uma associação entre infecções gástricas e *Aeromonas* presentes em águas de consumo humano.

Pseudomonas é o grupo bacteriano mais frequentemente encontrado em corpos de água. Contudo, a sua presença nem sempre indica um possível risco para a saúde pública. No entanto, algumas espécies foram ligadas a infecções associadas com a exposição a águas de recreio e foram assim propostas como bactérias indicadoras da qualidade das águas de recreio (Hurst *et al.*, 1997).

Amónia é convertida, num ambiente aquático, primeiro a nitrito e depois a nitrato pelas bactérias dos géneros *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*. Estas bactérias devem estar presentes em águas naturais e também em qualquer sistema intensivo de aquacultura.

A variabilidade nos resultados das contagens totais de bactérias notada em diversos trabalhos, resulta do elevado dinamismo da massa de água prospectada (ecossistema lótico) e da elevada taxa reprodutiva dos organismos bacterianos, ou ainda de uma série de factores ecológicos de natureza físico-química e biológica muito variados que condicionam a composição e o desenvolvimento de uma população bacteriana na água (Clapés, 1969; Moore, 1991; Sousa, 1996; Guinea *et al.*, 1979; Fidalgo, 1992) como a temperatura e outras características físico-químicas da água e do solo das margens, energia radiante (solar), disponibilidade de nutrientes, presença de bacteriófagos e de factores exógenos à massa de água, como a poluição, ou ainda a presença ocasional, nos efluentes das aquaculturas, de comida medicada, que pode ser

responsável pela selecção das bactérias resistentes às drogas utilizadas (Toranzo *et al.*, 1985) e de desinfectantes usados nas pisciculturas.

A temperatura da água influencia a diversidade da flora bacteriana. As variações da temperatura ao longo do ano podem afectar os grupos de bactérias a que os peixes estão expostos através da água ou da dieta.

A temperatura da água tem, também, uma grande relevância na prevalência das bactérias que vivem a temperaturas altas. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Plesiomonas shigelloides* e *Streptococcus* foram encontrados durante os meses quentes no intestino de peixes devido ao aumento da temperatura da água, sugerindo assim ser esta, uma situação de temperatura mais adequada para o crescimento destas espécies (MacMillan e Santucci, 1990). Ocorrem também variações periódicas no número de bactérias no trato digestivo de peixes, com o número de contagens viáveis totais a aumentar da primavera para o verão e a diminuir para o inverno (Cahill, 1990). Além disso, algumas bactérias fecais podem ser importadas para a água via mamíferos ou aves, que podem estar presentes somente periodicamente (MacMillan e Santucci, 1990). Baixas temperaturas ambientais podem prevenir a colonização por bactérias anaeróbias em espécies como a truta arco-íris (Cahill, 1990).

1.2.2 Presença de agentes patogénicos para o Homem

Existe uma grande variedade de bactérias. Normalmente no ecossistema, elas contribuem para a mineralização da matéria orgânica e servem de alimento a protozoários, contribuindo de uma maneira fundamental para a cadeia trófica (só agora é que se está a dar devida importância a esta fonte de carbono para o ecossistema). Isto aplica-se também ao ecossistema do nosso tubo digestivo, onde podem ser fonte de vitaminas. Quando existem alterações ambientais importantes, como por exemplo, por adição de matéria orgânica do exterior, algumas espécies podem dominar e tornar-se patogénicas nessas condições, da mesma maneira que se uma espécie animal dominar um ecossistema, pode rapidamente depauperá-lo.

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Saúde em 1993 (WHO, 1993), um total de 21 microrganismos foram reconhecidos como “agentes patogénicos perigosos transportados pela água”. A lista inclui agentes patogénicos humanos há muito tempo estabelecidos, como a *Escherichia coli* (*E. coli*) e o *Vibrio cholerae*, mas também um número considerável de microrganismos patogénicos mais recentes e oportunistas como a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* e o parasita *Cryptosporidium parvum* (WHO, 1993). De particular interesse é o número de epidemias para as quais os agentes causadores permaneceram desconhecidos (Morris, 1997). Nas 1648 epidemias registadas nos Estados Unidos da América entre 1920 e 1988, 72% eram descritas somente como “gastroenterites”. Mesmo com as melhorias actuais nos métodos de detecção, muitas epidemias continuam a ocorrer, cujo agente causal permanece desconhecido (Craun, 1995).

1.2.3 Indicadores de Eutrofização

1.2.3.1 Bactérias Heterotróficas Totais

O aumento dos números de células de determinados grupos de bactérias pode resultar do incremento de nutrientes trazidos pelas actividades humanas, nomeadamente pelo uso económico dado aos corpos de água naturais. Porém, as mudanças na composição da comunidade bacteriana podem constituir um indicador melhor da eutrofização.

Um número considerável de estudos já demonstrou uma forte relação entre eutrofização, actividade bacteriana e bactérias heterotróficas totais. Esta relação está bem ilustrada por um programa de monitorização plurianual em sistemas estuarinos dos Estados Unidos da América (Pedrós-Alió e Newell, 1989), onde altas contagens bacterianas até $3,2 \times 10^7$ UFC/ml têm sido registadas. Os efeitos de eutrofização nas linhas de água decorrentes dos efluentes das indústrias de criação de animais (principalmente suínos), também resultam no aumento dos números de bactérias heterotróficas totais viáveis e dos índices de produtividade bacteriana (Burkholder *et al*, 1997; Mallin *et al*, 1997), embora existam evidências de que outro tipo de poluição

(contaminação por metais pesados) podem fazer baixar os números de bactérias totais (Schwinghamer, 1988).

Estes estudos sugerem que uma monitorização a longo prazo das bactérias heterotróficas totais pode ser usada como um meio fiável de estimar o impacto na eutrofização de meios naturais resultantes de actividades antropogénicas e fornecer pistas para a remediação desses impactos. Contudo, os efeitos da variabilidade normal associada com os padrões das estações do ano e de outras influências locais, necessitam ser previamente definidos através de um acompanhamento a longo prazo, de forma a se poder utilizar as densidades de bactérias heterotróficas totais como meio de estimar o grau de eutrofização do meio natural.

1.2.3.2 Bactérias Ubíquas

As comunidades indígenas microbianas são compostas por diferentes agrupamentos de microrganismos. “Inputs” específicos de poluição associados com as diversas utilizações da água pode resultar em mudanças na composição taxonómica das comunidades aquáticas bacterianas (Lemke *et al*, 1997). Se estas mudanças puderem ser consistentemente associadas com usos particulares dados à água, então estes organismos podem ser usados como indicadores específicos de determinado tipo de poluição. Partindo deste ponto de vista, alguns investigadores têm começado a investigar o efeito dos diferentes tipos de poluição na abundância de microrganismos específicos ou de determinados grupos de microrganismos.

As bactérias pertencentes ao género *Pseudomonas* são uma componente ubíqua dos ecossistemas marinhos e de água doce. Estes organismos representam um dos mais funcionalmente diversos grupos de organismos existentes. Devido à sua versatilidade metabólica, um conjunto de investigadores têm notado a ocorrência de espécies de *Pseudomonas* em sistema aquático que têm sido claramente relacionados com usos particulares da água e das suas margens (Lemke *et al*, 1997; Guimarães *et al*, 1993).

Assim, diversos estudos têm comparado a abundância de certas espécies de *Pseudomonas* de particular interesse incluindo *Ps. aeruginosa* e *Ps. Putida* em ambientes poluídos e prístinos. A abundância de *Pseudomonas*, com respeito a contaminações resultantes das escorrências ácidas da indústria mineira, de componentes fenólicas, metais pesados, hidrocarbonetos e nutrientes têm sido investigados em ambientes marinhos, de água doce e estuarinos. Apesar dos resultados desses estudos, todos indicarem que o *Pseudomonas* é frequentemente o mais abundante grupo de microrganismos detectados, em geral, não existem muitas evidências da utilidade deste grupo de bactérias como indicadores de poluição.

Ao contrário, um género próximo do *Pseudomonas*, o género *Acinetobacter*, tem sido avaliado em estudos como potencial indicador de impactos antropogénicos em ecossistemas aquáticos. Assim, como o *Pseudomonas*, espécies de *Acinetobacter* representam um grupo de organismos metabolicamente diversos, que frequentemente representam uma significativa fracção dos microrganismos isoladas em amostras, essencialmente de água doce. Em pelo menos um desses estudos em cursos de água doce, espécies de *Acinetobacter* foram positivamente relacionados com poluição do rio (Lemke *et al.*, 1997). Nesse estudo, foi especulado que uma espécie de *Acinetobacter* foi favorecida nesse rio, por causa da sua capacidade de degradar, ou pelo menos de resistir a poluentes específicos associados a descargas de águas contaminadas. Estes resultados indicam um potencial aproveitamento de espécies deste género bacteriano como indicador alternativo de poluição, porém é necessário mais investigação no sentido de apurar a utilidade geral do género *Acinetobacter* como indicador.

Diversas outras espécies de bactérias, incluindo *Chromobacterium* têm sido estudadas no contexto de espécies indicadoras. No entanto, os resultados destes estudos são frequentemente ambíguos e, de igual forma ao descrito para o grupo *Acinetobacter*, desconhece-se ainda, se estas espécies podem ser aplicadas genericamente ou se continuarão limitadas a sítios específicos sob condições definidas. A presença e abundância de indicadores alternativos, que ocorrem habitualmente no meio natural, para a avaliação da saúde e funcionamento do ecossistema e a sua resposta a “inputs” antropogénicos, podem ser afectados não somente pelas descargas das actividades humanas, mas também, por condições não relacionadas com estas, como a variabilidade

normal devido à sazonalidade, ocorrências de tempestades e características físico-químicas ambientais dos corpos de água.

Alternativamente, uma vez que o funcionamento dos ecossistemas é, em último caso uma propriedade emergente de complexas interações entre diversas populações e variáveis ambientais, é provável que não existam espécies indicadoras universais e que a monitorização dos efeitos das actividades humanas nos cursos de água, requeiram critérios indicadores mais complexos. Por exemplo, a composição da comunidade bacteriana total, pode reflectir mudanças ambientais causadas por padrões de utilização dos rios e das suas margens.

1.2.3.3 Comunidades Bacterianas

O funcionamento dos sistemas microbianos depende de interações complexas entre microrganismos, condições abióticas e bióticas do ambiente, mecanismos metabólicos de regulação e adaptação e relações bióticas entre microrganismos e organismos superiores. O grande número de variáveis que podem influenciar as comunidades bacterianas, leva a que se estabeleçam comunidades únicas que reflectem a totalidade dessas interações (Gonzalez *et al.*, 1996). Mais, as mudanças nos padrões ambientais que são de esperar pelos diferentes usos da água pelas populações humanas, influenciam não só o funcionamento das comunidades bacterianas, mas também a sua composição e estrutura (Hiorns *et al.*, 1997). A questão principal que permanece por responder é se as mudanças na composição bacteriana são reproduzíveis e previsíveis, e possam assim ser usadas para avaliar e acompanhar os efeitos do desenvolvimento económico com repercussões nos cursos de água.

1.2.4 A Importância Ecológica das Bactérias Viáveis Não Cultiváveis

Em microbiologia, os termos viável e cultivável são frequentemente discutidos. No entanto, em anos recentes, a expressão aparentemente contraditória viável-não-cultivável tem sido aplicada a células com diversos e frequentemente mal definidos

atributos fisiológicos, as quais não foi ainda possível cultivar por métodos normalmente apropriados para esse tipo de microrganismo. O interesse renovado por este tipo de microrganismos resulta de três razões principais: 1) O reconhecimento de que existem muitas bactérias na biosfera que nunca foram propagadas ou caracterizadas em culturas de laboratório; 2) A constatação de que algumas bactérias já cultivadas respondem a certos estímulos entrando num estado de temporariamente não cultivadas designado de viável mas não cultivável; 3) O desenvolvimento de novas técnicas que facilitam a demonstração de actividade, integridade e composição das células bacterianas não cultiváveis (Colwell e Grimes, 2000).

Numerosas células bacterianas de espécies normalmente cultiváveis encontram-se no estado de viáveis porém não cultiváveis. A redução dos nutrientes disponíveis, baixas temperaturas e outras situações stressantes podem levar as bactérias a entrar nesse estado. É ainda controverso se o estado de viável mas não cultivável representa uma forma de resistência ou de pré-morte das bactérias. As bactérias na água encontram-se frequentemente “famintas” ou em stress e nessas condições são menos reactivas e ocorrem na forma de células mais pequenas. Se estas bactérias forem incubadas na presença de nutrientes, extracto de levedura e ácido nalidixico (ou ciprofloxacina), a maquinaria celular é retomada, e as células começam a alongar-se.

A interpretação ecológica das bactérias viáveis não cultiváveis na água é muito difícil devido à presença de diferentes classes de células não cultiváveis no interior das comunidades naturais. Uma primeira classe de células não cultiváveis consiste naquelas espécies de bactérias que são perfeitamente cultiváveis nas condições normais de laboratório, mas que, no entanto podem entrar num estado de não cultiváveis quando sujeitas a condições de crescimento stressantes. Uma segunda classe de bactérias não cultiváveis é representada pelas bactérias formadoras de colónias em placas de agar ou meio líquido com uma baixa eficiência. A terceira classe de bactérias não cultiváveis é aquela que é incapaz de crescer e reproduzir-se nas condições tradicionais de cultura, devido a requisitos de crescimento desconhecidos. Estas últimas incluem a maior parte das bactérias simbióticas e nunca foram isoladas. A sua identificação é apenas possível pelas técnicas de clonagem. Todas as classes de bactérias não cultiváveis podem existir nas comunidades naturais. Sendo assim, as razões pelas quais não se consegue que

determinadas células formem colónias podem ser tão diversas como as espécies consideradas (Colwell e Grimes, 2000).

1.2.5 Bactérias Aderidas ao Substrato

Entre os anos de 1930 e 1940 Claude Zobell investigou a afinidade das bactérias para as superfícies, o seu trabalho pioneiro marcou o início da pesquisa moderna dos “biofilmes”. Os “biofilmes” podem ser descritos como células imobilizadas à superfície e frequentemente embebidas numa matriz de polímeros orgânicos de origem microbiana (Charaklis e Marshall, 1989). Nessas superfícies os microrganismos encontram um ambiente protegido de efeitos prejudiciais como por exemplo da concentração de oxigénio, tratamentos por agentes antibacterianos (500 vezes mais resistentes) e do potencial redox, constituindo assim um reservatório potencial muito importante de bactérias (Keevil *et al*, 1993). Daí, torna-se evidente que a vida nas superfícies é o modo de existência dominante dos microrganismos, tornando por isso a análise da comunidade microbiana do sedimento e das superfícies, uma componente essencial de qualquer estudo acerca da bacteriologia ambiental.

Recentemente, descobriu-se que a adesão das bactérias desencadeia a expressão de um factor que suprime uma quantidade apreciável de genes, fazendo com que as células nos “biofilmes”, sejam fenotipicamente distintas das suas homólogas planctónicas. Cada bactéria do “biofilme” vive num micronicho adaptado, numa comunidade microbiana complexa com homeostasia primitiva, exibindo cooperação metabólica e cada uma destas células césseis reage ao seu ambiente particular, de uma forma única diferente das células planctónicas da mesma espécie. Além do mais, todos os aspectos do comportamento dos “biofilmes” é controlado por sinais químicos análogos ao das hormonas e ferormonas, que controlam o comportamento dos organismos superiores. Esta descoberta, imediatamente levantou a excitante possibilidade de se poder controlar o comportamento dos “biofilmes”, através da estimulação ou do bloqueio por sinais análogos aqueles que nós usamos para controlar as funções do nosso próprio corpo com fármacos (Costerton *et al*, 1995).

1.3 Doenças nos Peixes Selvagens

O papel que as doenças têm na regulação dos salmonídeos selvagens ou de outros peixes selvagens é largamente desconhecido. A distribuição e o tamanho das populações de peixes é largamente determinada pela interação das populações com outros organismos e o seu meio ambiente. Predação, competição, habitat, clima e restrições ao movimento são alguns dos factores primordiais que determinam as características da população (Krebs, 1994). Uma população pode crescer pelo aumento da imigração ou da taxa de nascimentos e pode decrescer pelo aumento da emigração ou da taxa de mortalidade (Scott e Smith, 1994).

É difícil para muitos ecologistas aceitar que as doenças desempenham um papel predominante na estabilidade a longo prazo das populações de ocorrência natural (Croze, 1981). As doenças podem no entanto ter um efeito negativo nas populações. Pelo aumento da taxa de mortalidade ou diminuição da taxa de natalidade, as doenças podem reduzir a abundância da espécie e influenciar a sua distribuição. Doenças podem ainda actuar como um factor dependente da densidade, que regula e restringe o número e o tipo de organismos, que podem viver num dado ambiente (Croze, 1981).

Em geral, os investigadores não conseguem quantificar o impacto das doenças em indivíduos ou populações de peixes selvagens (Stephen e Iwama, 1997). Normalmente, os problemas significativos relativos a doenças em peixes selvagens, são largamente desconhecidos da maioria e não existem registos das ocorrências. Mortalidades dramáticas de peixes selvagens são muitas vezes associados a fenómenos de alterações abruptas ambientais, ainda que o aparecimento de doenças infecciosas tenham também sido registadas (Mollers e Anders, 1986; Kent e Fournie, 1993).

A razão principal para a incerteza no que diz respeito ao papel das doenças nas populações de peixes é que a interação existente entre o peixe e o organismo causador da doença encontra-se sob a influência de uma grande variedade de factores ecológicos e ambientais. Esta variedade leva a resultados muitas vezes imprevisíveis. Dependendo dessas condições, o microrganismo pode ser inofensivo para um grupo de peixes,

enquanto que se as condições forem outras, isso pode resultar em mortalidades massivas. A detecção de um agente teoricamente capaz de causar doenças ou a detecção de um sintoma particular em alguns peixes, raramente são a base para o estabelecimento fiável da natureza do efeito que possa ocorrer na população (Stephen e Iwama, 1997).

As tentativas para estudar doenças em peixes selvagens enfrentam dificuldades metodológicas, talvez a mais significativa das quais seja a dificuldade em detectar peixes doentes na natureza. Além de que os indivíduos doentes são perdidos para os predadores antes de que os humanos os possam apanhar (Kent e Fournie, 1993). Assim, as amostras de peixes selvagens raramente fornecem informação suficiente que possa ser extrapolada para a população inteira.

Os esforços para compreender as doenças de peixes são ainda complicadas pela falta de conhecimentos de patofisiologia de muitas espécies selvagens (Kent and Fournie, 1993). Ainda que existam diversos livros e publicações científicas respeitantes a doenças de salmonídeos e de outras espécies importantes comercialmente, pouco é conhecido acerca da resposta a doenças de espécies não comerciais sujeitas a condições naturais. No que diz respeito a doenças, os peixes comportam-se de maneiras diferentes. A possibilidade de contraírem doenças infecciosas pode diferir entre as diferentes espécies de peixes, bem como entre subespécies. A história natural, comportamento e distribuição geográfica de uma espécie particular podem afectar o tipo e o risco de doenças que um peixe irá enfrentar ao longo da sua vida. Não é por isso razoável assumir que todos os peixes numa determinada área enfrentam os mesmos riscos de doença.

1.4 Expressão da Doença

Existe uma variedade de classes de doenças incluindo genéticas, nutricionais, de desenvolvimento, imunológicas, infecciosas e neoplásicas. Porém, praticamente toda a informação publicada aborda a classe das doenças infecciosas, e os motivos para isso, segundo Stephen e Iwama (1997), são: 1) a maior parte da investigação envolve doenças

infecciosas; II) doenças parasíticas e infecciosas são as mais comumente observadas em instalações de aquacultura; III) os organismos patogénicos e parasíticos são observados tanto em aquacultura como no estado selvagem; IV) recentemente surgiu um alerta generalizado na opinião pública acerca das questões das doenças infecciosas no Homem; V) As rotas potenciais de actuação de outras formas de doenças são menos conhecidas.

É importante lembrar que a presença de organismos patogénicos ou parasitas não é equivalente à presença da doença e que a expressão da doença é o resultado de complexas interacções entre agentes, hospedeiros e o ambiente partilhado (Stephen e Iwama, 1997). Segundo estes autores, quando se pretende determinar o risco de transmissão de organismos patogénicos, deve-se considerar as características do organismo, incluindo a sua capacidade de se multiplicar e permanecer viável na água, o tempo de sobrevivência fora do hospedeiro e o número de unidades infecciosas necessárias para causar infecções. Devemos considerar também, factores relativos ao hospedeiro, tais como susceptibilidade a infecções, exposição aos organismos patogénicos, idade, estado de saúde, condições preexistentes e condições de cultura. Considerações ambientais devem também ser incluídas como o efeito do clima, hidrografia e qualidade da água.

1.5 Avaliação dos Riscos Microbiológicos

Doenças infecciosas constituem um grave problema para o cultivo de salmonídeos. A sua ocorrência é mais frequentemente documentada em aquacultura do que nos peixes selvagens. Isto levou alguns investigadores à conclusão de que a actividade é responsável pela origem de doenças infecciosas nos stocks selvagens (Hastein e Linstad, 1991). No entanto, existem poucas provas de significativos efeitos adversos, devidos a agentes infecciosos das aquaculturas, para os peixes selvagens (Austin e Allen-Austin, 1993). Quando as doenças realmente ocorrem nos stocks selvagens que habitam águas partilhadas com peixes cultivados, é difícil determinar se os agentes infecciosos provêm do meio ambiente ou das instalações de aquacultura (Saunders, 1991). Com o advento de novas ferramentas de diagnóstico, muitos agentes

patogénicos têm sido descobertos. E, devido a uma maior intensidade de observações e colheitas regulares de salmonídeos cultivados, comparativamente com os peixes selvagens, pode-se afirmar que doenças anteriormente não identificadas, venham a ser descritas em triculturas antes de serem detectadas nos stocks selvagens (Stephen e Iwama, 1997).

Está relativamente demonstrado que agentes patogénicos de peixes se movimentam de peixes selvagens para peixes cultivados (Kent e Fournie, 1993; Moller e Anders, 1986). O que ainda permanece obscuro é a magnitude das doenças transferidas na direcção oposta, de peixes cultivados para peixes selvagens. A questão crítica é se o aumento de exposição aos agentes causadores de doenças provenientes das triculturas é suficiente para aumentar a ocorrência de doenças nos stocks selvagens, para níveis que possam pôr as populações de peixes selvagens em desvantagem biológica.

Munro *et al* (1976) demonstraram que uma variedade de espécies nativas podem adquirir doenças infecciosas a partir de peixes cultivados. Por exemplo, *Yersinia ruckeri* pode ser transferida na água, porém, (Roberts, 1985) realizou programas de vigilância de peixes selvagens, à volta de aquaculturas onde se verificaram surtos da doença da “boca vermelha” e não se encontrou nenhuma prova da doença. O aparecimento deste microrganismo nos peixes selvagens, nos peixes cultivados e nos mamíferos aquáticos, sugere uma fonte comum ambiental, como por exemplo aves aquáticas, as quais são, mais provavelmente, as responsáveis pela distribuição do microrganismo (Collins *et al*, 1996).

Uma população de peixes selvagens pode hipoteticamente encontrar-se em risco acrescido de patogenias endémicas se a tricultura aumentar as oportunidades de exposição dos peixes selvagens a concentrações de agentes patogénicos viáveis capazes de causar doenças (Stephen e Iwama, 1997). Os peixes cultivados podem espalhar no ambiente agentes patogénicos através de uma variedade de meios incluindo mucos, fezes, e peixes moribundos. Um estudo norueguês reforçou a ideia da importância da utilização de fontes de água livres de peixes cultivados. Neste estudo (Jarp *et al*, 1993), evidências epidemiológicas demonstraram que o maior factor de risco para a ocorrência

de furunculose em peixes cultivados era o uso de águas contendo peixes anádromos. Este estudo também indicou que o risco de infecção com furunculose será 2 vezes maior em instalações de truticulturas situadas a menos de 10km entre elas num rio. Os autores concluíram assim, que uma alta concentração de truticulturas infectadas com *A. salmonicida* seria um importante factor de risco de infecção com o organismo e especulou que peixes portadores cultivados serão o meio pelo qual o organismo é disseminado.

1.6 Interações entre Peixes Selvagens e Cultivados

1.6.1 Peixes Selvagens na Proximidade das Truticulturas

As operações das truticulturas, em geral, atraem organismos pelágicos e bênticos (Iwama, 1991). O aumento da biomassa à volta das aquaculturas pode ser explicado em parte pela presença de peixes fugitivos (Carss, 1990), e também pela presença de outros peixes que são atraídos pelas truticulturas e podem aí encontrar comida e habitat protector. Outros investigadores encontraram peixes predadores e não predadores em número elevado, com alta taxa de crescimento e sobrevivência à volta de truticulturas de truta arco-íris (Hays, 1980; Loyacano e Smith, 1975; Kilambi *et al*, 1978). Observações visuais e do conteúdo do tracto gastro-intestinal de peixes selvagens à volta das truticulturas mostraram que os peixes selvagens ingerem comida e fezes de peixes cultivados (Phillips *et al*, 1985). No entanto, pouco se sabe acerca do tempo que as espécies migratórias passam à volta das truticulturas. Anon (1991) realizou na Noruega um estudo que envolveu a libertação de salmões cultivados e marcados electronicamente, que sugere que os salmões visitam outras instalações de aquacultura.

1.6.2 Fugas de Peixes Cultivados

Outro mecanismo para a transferência de doenças é através de peixes fugitivos. Como foi já discutido, é improvável que um peixe doente se desloque para longe depois da sua fuga. Mais, é igualmente improvável que um peixe doente se comporte normalmente, particularmente nas suas tentativas de encontros sociais. No entanto

podem ocorrer para algumas doenças estados de portadores assintomáticos. Poucos dados se conhecem acerca da quantidade de organismos patogénicos levados por estes últimos (O'Brien *et al*, 1994). Alguns autores acreditam que, no caso da furunculose, todos os sobreviventes de uma epizootia desta natureza se tornem portadores (McCarthy e Roberts, 1980). No entanto, julga-se que os peixes saudáveis portadores estejam envolvidos na transmissão deste microrganismo.

Problemas técnicos, particularmente a capacidade de detectar peixes portadores com grande segurança, têm limitado a pesquisa nesta área e gerado resultados conflituosos (Stephen e Iwama, 1997). Num estudo, onde uma grande proporção de peixes se verificou ser portador de *Aeromonas salmonicida*, nunca foi relatada uma epizootia de furunculose na tricultura de origem desses peixes (MacCarthy e Roberts, 1980). De igual modo, nunca foi detectada a furunculose em peixes selvagens num pequeno rio canadiano, depois de um programa de dois anos de repovoamento com trutas portadoras e trutas não-infectadas (MacCarthy e Roberts, 1980).

1.7 Mudanças Ambientais e a Aquacultura

A exposição a um agente patogénico não é suficiente para causar uma doença. Para que um agente patogénico afecte uma população de peixes, algumas condições devem ser reunidas: a população exposta deve ser susceptível à estirpe do agente presente e deve haver suficiente exposição ao agente patogénico que deve permanecer viável o tempo suficiente para causar a doença (Stephen e Iwama, 1997). A dinâmica da população do agente deve ser tal que a doença possa ser perpetuada de modo a causar efeitos adversos na população (Scott e Smith, 1994). A susceptibilidade de um peixe às doenças infecciosas aumenta bastante se alguns factores internos ou externos comprometerem o seu sistema imunitário. Os factores de stress ambientais podem actuar de forma a comprometer o sistema imunitário.

Nem sempre os agentes patogénicos em aquacultura são organismos obrigatoriamente patogénicos (Boeger e Guimarães, 2000). Segundo os mesmos

autores, muitas das espécies de bactérias causadoras de enfermidades em peixes são saprófitas encontradas naturalmente no meio ambiente. Essas espécies são importantes no processo de remineralização da matéria orgânica no meio ambiente. Todavia, a redução na capacidade de resistência “permite” a invasão do corpo do peixe por espécies oportunistas, causando epidemias em cultivo (Toranzo *et al*, 1985; Boeger e Guimarães, 2000).

Outros organismos são, todavia, verdadeiramente parasitas e precisam de hospedeiro para sobreviver. Em condições ideais, a densidade de agentes patogénicos num cultivo pode ser mantida baixa, através da manutenção dos mecanismos de defesa dos peixes em níveis elevados. Adicionalmente, organismos patogénicos podem actuar como agentes stressantes, promovendo a redução da capacidade de resistência, “abrindo” portanto, caminhos para a invasão do corpo do peixe para outros agentes verdadeiramente patogénicos ou oportunistas (Boeger e Guimarães, 2000).

Segundo o mesmo autor em geral, seja qual for o meio pelo qual a resistência dos peixes é reduzida, uma epizootia nunca é monoespecífica, ou seja, a baixa na capacidade de resistência dos peixes causada pelo stress, resulta na proliferação de enfermidades provocadas por um conjunto de espécies patogénicas diferentes.

1.7.1 Factores de Stress Ambientais

1.7.1.1 Químicos

Factores de stress ambientais incluem condições químicas adversas da água. Apesar de os poluentes serem imediatamente identificados como factores de stress ambientais, condições extremas ou mudanças nos parâmetros de qualidade da água, como o oxigénio dissolvido, amónia, dureza, pH, conteúdo e pressão parcial de gases podem colocar o peixe sob condições de stress e levar à doença (Meyer *et al*, 1983; Wood, 1979).

Indústria, actividades domésticas e agrícolas podem acrescentar uma variedade de contaminantes ao ambiente os quais podem afectar adversamente os peixes em todos

os estados da vida. Os resultados dos estudos acerca da extensão da produção de factores de stress ambientais por parte das truticulturas variam. O oxigénio é essencial para a sobrevivência. O abaixamento da pressão de oxigénio pode afectar seriamente os peixes. Em águas eutrofizadas, ocorrem grandes flutuações no teor do oxigénio dissolvido (Snieszko, 1974). O abaixamento do oxigénio dissolvido ocorre devido à acumulação de desperdícios de comida e matérias fecais das truticulturas (Parsons *et al*, 1990).

A possibilidade de eutrofização do ambiente associada com as actividades de aquacultura têm sido consideradas como possíveis causas de stress nos peixes selvagens. A produção de amónia, quando acima de níveis específicos, pode actuar como factor de stress nos peixes (Stoskopf, 1993). Estudos efectuados na Noruega mostraram que os desperdícios das truticulturas podem afectar os níveis de amónia superficiais (Levings, 1994). Samuelsen *et al* (1988), mostraram que uma variedade de gases tóxicos para peixes estavam presentes nos sedimentos em redor das aquaculturas, incluindo metano e dióxido de carbono.

Outro assunto importante, relacionado com o stress ambiental devido às truticulturas, é a introdução de contaminantes químicos. Os químicos são introduzidos na água pelas aquaculturas por um conjunto de razões, que vão desde o controle de agentes patogénicos até à preservação e protecção do equipamento. É provável que os efeitos imunossupressores resultantes das alterações ambientais seja mais rapidamente notada nos stocks cativos (Stephen e Iwama, 1997). A capacidade que o peixe cativo tem de evitar os factores de stress ambientais é limitado pelo seu confinamento nas truticulturas.

1.7.1.2 Biológicos

“Blooms” de algas nocivas são exemplos do diferente efeito dos factores de stress ambientais em peixes selvagens e nos peixes cultivados. Durante um “bloom” a distribuição das algas na coluna de água é limitada. Observações de instalações de

cultivo de salmonídeos revelaram que estes tentam procurar áreas nas instalações com concentrações mais baixas de algas (Stephen e Iwama, 1997).

Como estão confinados às fronteiras dos tanques, muitos desses peixes são incapazes de escapar aos factores de stress ambientais, enquanto que os peixes selvagens têm a opção de se mover para longe. Devido à sua capacidade de se moverem para longe de situações de stress, os peixes transeuntes ou aqueles que possuem um grande raio de acção, não passam tempo suficiente à volta das truticulturas para se expor a quantidades suficientes de factores crónicos de stress para poderem ter impacto na sua susceptibilidade à doença. Contudo, se outros factores prendem o peixe à vizinhança de uma truticultura, como o território, ninhos, ou utilização de restos de comida, pode haver suficiente oportunidade para a exposição a factores de stress crónico (Stephen e Iwama, 1997).

1.8 Microrganismos Patogénicos de Peixes de Declaração Obrigatória

1.8.1 *Aeromonas salmonicida*

Esta bactéria causa uma infecção conhecida como furunculose e possui bacilos curtos, Gram negativos, fermentativos, imóveis. *A. salmonicida* é capaz de produzir, após 3-4 dias de incubação a 20-25 °C, um pigmento castanho difusível em meios sólidos contendo tripton. Estes testes, juntamente com a não produção de ácido da xilose e da sacarose, permitem geralmente uma identificação presumível desta espécie, porém é conveniente proceder também aos testes de degradação da gelatina (positivo), do amido (positivo) e da ureia (negativo), da presença de arginina deidrolase (positivo) de oxidação do gluconato (negativo) e da presença da descarboxilase da ornitina (negativo). É de notar que esta descrição típica pode variar em alguns testes (Sousa, 1996).

A forma crónica da furunculose é caracterizada por uma lesão necrótica profunda do músculo, o “furúnculo”. A forma aguda da doença pode ser caracterizada por uma condição difusa hemorrágica. Histologicamente, hemorragias e focos da bactéria podem ser vistos em tecido cardíaco, hematopoiético, hepático e guelras.

Permanecem algumas dúvidas quanto aos factores que controlam ou determinam a disseminação deste microrganismo, sendo de difícil isolamento em amostras ambientais, talvez devido à competição existente em culturas mistas, onde o seu crescimento é rapidamente inibido, ou ao aparecimento de um estado de latência em certas condições ambientais (Sousa, 1996). A espécie é actualmente definida como sendo patogénica obrigatória de peixes, e não se encontrando, assim, em águas superficiais. Normalmente, *A. salmonicida* não se consegue isolar da água das pisciculturas onde ocorre uma epizootia de furunculose (Sousa, 1996).

Esta espécie bacteriana pode ser transmitida horizontalmente, quer através do contacto com peixes infectados (doentes ou portadores), de água contaminada ou de utensílios utilizados na piscicultura (Sousa, 1996). Ainda segundo este autor, a transmissão vertical nunca foi demonstrada, embora a bactéria tenha sido isolada dos produtos sexuais de peixes infectados. Por isso, recomenda-se a desinfecção prévia dos ovos transferidos para áreas livres da furunculose.

1.8.2 *Yersinia ruckeri*

Yersinia ruckeri é o agente etiológico da doença da “boca vermelha”, uma doença de peixes observada pela primeira vez, por Rucker, no início da década de 1950, no vale de Hagerman, no Estado de Idaho (Estados Unidos da América), onde causou perdas económicas importantes nas pisciculturas de truta arco-íris (Sousa, 1996). Esta doença ocorre geralmente nos salmonídeos e é particularmente problemática em trutas arco-íris.

O microorganismo tem a seguinte descrição: bacilos rectilíneos ou ligeiramente encurvados, tendo, em média, 1,5 a 3µm de comprimento e 0,5 a 1µm de largura,

embora se possam observar formas filamentosas em culturas velhas (mais de 48 horas a 25 °C) (Ross *et al.*, 1966; Romalde, 1992; Austin e Allen-Austin, 1993; Furones *et al.*, 1993); Gram negativos, móveis (dependendo da temperatura de incubação) com flagelação peritrica, fermentativos, oxidase negativos, e não produtores de pigmento, tendo sido classificado na família *Enterobacteriaceae* (Ross *et al.*, 1966), por esta razão, passou a chamar-se “Enteric Redmouth Bacterium”, mais tarde confirmado por Ewing *et al.* (1978) ao efectuar estudos de hibridação de DNA. Ewing *et al.* (1978) classificaram a bactéria no género *Yersinia*, como *Y. ruckeri* (em homenagem a R. R. Rucker), devido à percentagem G+C, cujo valor em *Y. ruckeri* (47,5-48,5%) se encontrava dentro do intervalo observado em *Yersinia* (46-50%).

Y. ruckeri permanece, porém ainda hoje, “uma espécie bacteriana em busca de um género melhor como lugar final” (Farmer *et al.*, 1985, *in* Romalde, 1992). Assim, embora pareça não haver dúvidas de que as estirpes conhecidas desta espécie pertencem à família *Enterobacteriaceae*, é necessário que estudos adicionais venham a demonstrar se esta bactéria pertence a outro género já estabelecido ou se será suficientemente diferente para justificar a criação de um género novo (Furones *et al.*, 1993).

Waltman e Shotts (1984) desenvolveram um meio (SW) selectivo/diferencial para *Y. ruckeri*, o qual contém Tween 80, sacarose e azul de bromotimol. A distinção de *Y. ruckeri* neste meio baseia-se na capacidade desta bactéria de hidrolisar o Tween 80 e na sua incapacidade de fermentar a sacarose. As colónias desta bactéria no meio SW são pequenas e aparecem de cor verde pálido (devido à não fermentação da sacarose) e circundadas por uma zona de hidrólise do Tween 80 (esta hidrólise é visualizada pela formação de um halo de deposição de complexos oleato-cálcio à volta da colónia, pelo que é necessário a presença de CaCl₂ no meio).

Para os seus autores, o meio SW tem ainda, as vantagens de ser tão sensível como o Agar de MacConKey e como o TSA para o crescimento de *Y. ruckeri*, ser barato e fácil de preparar. No entanto, nem todos as estirpes de *Y. ruckeri* hidrolisam o Tween 80 e, portanto, as interpretações dos resultados obtidos terão de ser feitas com muito cuidado (Sousa, 1996).

O sistema miniaturizado API 20E, desenvolvido para uso em medicina humana, tem sido usado em muitos estudos de *Y. ruckeri*, com uma modificação das condições de incubação (temperatura e tempo) (Rintamaki *et al.*, 1986; Dear, 1988; Davies e Frerichs, 1989; Romalde & Toranzo, 1991; Romalde, 1992; Furones *et al.*, 1993; Santos *et al.*, 1993; Sousa, 1996). Embora este sistema seja rápido e conveniente para a identificação de *Y. ruckeri*, é necessária uma interpretação cuidadosa dos perfis resultantes, uma vez que algumas reacções diferem das obtidas com testes convencionais (Stevenson & Daly, 1982; Davies & Frerichs, 1989; Dear, 1988; Romalde & Toranzo, 1991; Romalde, 1992; Furones *et al.*, 1993).

Em 12 amostragens mensais efectuadas em duas truticulturas galegas, Romalde *et al.*, (1994) detectaram um nível de infecção crónico, com picos de detecção de *Y. ruckeri* nos períodos de fim da Primavera-início do Verão (meses de Maio e Junho) e Outono (meses de Setembro e Outubro). Também Rodgers (1991) refere que várias truticulturas britânicas têm sofrido epizootias da doença da boca vermelha (ERM) todos os anos desde a sua confirmação inicial, e que estas epizootias ocorrem principalmente entre os meses de Abril e Setembro. Por outro lado, Romalde *et al.* (1994) verificaram que o aumento dos números de *Y. ruckeri* detectados nas amostras de água e de sedimento coincidiu com o isolamento da bactéria a partir de peixes, aparentemente saudáveis, amostrados em diversos tanques das truticulturas.

A transmissão da doença ocorre horizontalmente, através da água (Sousa, 1996). Embora *Y. ruckeri* possa ser isolada facilmente dos reprodutores infectados aquando da desova, a sua transmissão vertical ainda não foi demonstrada, e essa possibilidade parece ser praticamente nula quando, após a fertilização, se procede à desinfecção dos ovos com iodóforos (Busch, 1983; Romalde, 1992; Furones *et al.*, 1993).

Num estudo laboratorial, Hunter *et al.* (1980) demonstraram que os peixes portadores constituem uma importante fonte de infecção quando se encontram em condições que lhes provocam stress. As trutas arco-íris portadoras de *Y. ruckeri* que os autores sujeitaram a stress térmico (elevando a temperatura para 25 °C) transmitiram a bactéria a exemplares saudáveis, ao contrário do que se verificou com trutas portadoras que não foram submetidas ao stress.

Outros possíveis reservatórios de *Y. ruckeri*, podem ser outros animais nos quais esta bactéria tem sido encontrada em grandes números. Estes possíveis disseminadores da ERM incluem peixes selvagens (Willumsen, 1989) ou ornamentais (McArdle e Dooley-Martyn, 1985; Austin & Allen-Austin, 1993), invertebrados aquáticos entre os quais o caranguejo do rio (Austin & Allen-Austin, 1993) e, mesmo, animais terrestres nomeadamente aves e mamíferos (Stevenson & Daly, 1982; Willumsen, 1989; Romalde, 1992; Austin & Allen-Austin, 1993; Furones *et al.*, 1993).

Austin & Allen-Austin (1993), referem subsistir alguma controvérsia sobre a ecologia de *Y. ruckeri*, que por um lado é considerada como sendo uma bactéria saprófita aquática normal e, por outro lado, incapaz de viver livremente na água por extensos períodos de tempo apesar de poder sobreviver durante 2 meses no sedimento. No entanto, outras experiências referidas por estes autores demonstraram que este microrganismo foi capaz de sobreviver durante 4 meses em água com salinidades entre 0 e 20‰ (a sobrevivência em água do mar era menor), o que implica que *Y. ruckeri* é capaz de sobreviver na coluna de água (doce) durante um longo período de tempo após a ocorrência de uma epizootia de ERM. Também Romalde *et al* (1994) isolaram *Y. ruckeri* num local de um rio situado 15 Km a jusante de uma truticultura, o que levou os autores a especular que, por um lado, a bactéria poderia ser uma espécie nativa, encontrada no rio em condições naturais, que infecta os peixes das instalações aquícolas através da água que entra nestas, ou, por outro lado, a presença desta espécie bacteriana no rio resulta da introdução nestas instalações de trutas sem um controle sanitário adequado. Estes autores concluem que o seu trabalho demonstrou que a presença de *Y. ruckeri* na água e no sedimento se estendeu ao longo de todo o ano de amostragens e, conseqüentemente, existe um risco de epizootias quando ocorrem as temperaturas e/ou condições de stress que favorecem o desenvolvimento do microrganismo.

No entanto, Busch (1983) e Thoesen (1994) não consideram que *Y. ruckeri* tenha uma ocorrência ubíqua. Barja e Toranzo (1988) admitem que esta bactéria seja habitante do tubo digestivo dos peixes, do qual é expulsa para o meio ambiente através das fezes.

Capítulo 2.

OBJECTIVOS

2. OBJECTIVOS

Neste trabalho propõe-se a avaliação do impacto de uma truticultura na comunidade bacteriana de um pequeno rio, designadamente através do estudo dos grupos bacterianos presentes nas amostras ambientais, do seu número e da sua variação sazonal.

O presente trabalho procura determinar se os grupos bacterianos detectados são, de um modo geral, similares aos referidos na generalidade dos trabalhos publicados sobre este assunto.

Procura também determinar se os grupos detectados nas amostras de sedimento reflectem, em qualidade e abundância, os detectados nas amostras de água.

Finalmente, pretende-se saber se nos grupos bacterianos detectados se incluem aquelas espécies cuja declaração é obrigatória.

Pretende-se assim, observar o impacto da actividade da truticultura no rio, no que diz respeito à exposição a factores de risco de doenças no ambiente.

Capítulo 3.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Objecto de Estudo

Este trabalho tem como objecto de estudo um pequeno rio da Bacia Hidrográfica do rio Douro, onde está instalada uma exploração de aquacultura que se dedica ao cultivo de trutas, da espécie truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*).

Estes exemplares encontram-se em instalações do tipo “raceways”, que consistem em séries de tanques de betão colocados paralelamente, partilhando as paredes interiores. A truticultura, que se encontra localizada paralelamente ao rio, numa cota superior, é alimentada de água através de um canal que deriva do próprio rio e, por gravidade, vai percorrendo sucessivamente as séries de “raceways” colocadas em terraços corrente abaixo, até ser descarregada novamente para o rio.

O arejamento ocorre entre os “raceways” à medida que a água flui por uma conduta existente na saída de cada série, que distribui a água na próxima série de “raceways” através de uma cascata de água. Na truticultura encontram-se também alguns tanques circulares de aço-inox com o fundo cónico para mais fácil remoção das lamas.

Nestas instalações alguns exemplares permanecem durante todo o seu ciclo de vida, uma vez que as instalações estão equipadas com incubadoras para os ovos, e possui tanques onde se encontra uma população de reprodutores, enquanto outros são transferidos para outra truticultura para crescimento e engorda. Periodicamente, verifica-se a importação de ovos dos E.U.A. e do Reino Unido.

3.2 Tipos de Amostras

Foram recolhidos dois tipos de amostras, sedimento e água, em três locais predeterminados, um dois quais a montante da truticultura no local de onde parte o canal que conduz a água do rio para as instalações, a cerca de 200m a montante destas (ponto 1), outro, junto da última saída do efluente que transporta a água da truticultura de volta ao rio (ponto 2), por último, foram recolhidas amostras a jusante, a cerca de 1,5Km da truticultura (ponto 3).

Cada amostragem consistiu na recolha de água e de sedimento em cada um dos locais predeterminados da seguinte maneira: a água foi recolhida a cerca de 15 cm abaixo da superfície, em frascos de 100 ml esterilizados, e o sedimento recolhido no fundo do rio, a cerca de 1 metro da margem, em frascos de 100 ml esterilizados.

Ambos os tipos de amostras foram transportados para o laboratório em recipiente isotérmico, onde foram imediatamente processadas, ou então guardadas em frigorífico (4°C) para serem processadas dentro, no máximo de 24 horas, quando o seu processamento imediato não foi possível.

Paralelamente à recolha das amostras, determinou-se a temperatura da água em cada um dos locais. Os valores de outros parâmetros foram determinados (Branco, dados não publicados). No entanto, este trabalho encontra-se atrasado, pelo que não é possível apresentá-los.

3.3 Procedimento

Pesou-se 10 g de cada amostra de sedimento, em condições assépticas, numa caixa de papel de estanho estéril, de seguida, colocou-se num matraz com 90 ml de soro fisiológico estéril. Agitou-se fortemente e deixou-se repousar durante 5 minutos.

As amostras de água e sedimento foram então, submetidas, assepticamente, a diluições decimais seriadas, em soro fisiológico estéril. De seguida, procedeu-se, igualmente em condições de assepsia, ao espalhamento de 0,1 ml de inóculo de cada diluição numa placa com os meios de cultura utilizados (Plate Count Agar e meio diferencial para *Yersinia ruckeri* SW).

3.4 Isolamento de Bactérias

Para o isolamento e conservação das bactérias, foram utilizados os seguintes meios de cultura.

3.4.1 Plate Count Agar

Para a pesquisa de bactérias heterotróficas viáveis aeróbias/anaeróbias facultativas foi utilizado o meio de cultura Plate Count Agar (PCA, Merck). É um meio isento de substâncias inibidoras e de indicadores, concebido essencialmente para a determinação do número de bactérias viáveis em água, leite, produtos lácteos, alimentos, etc.

As placas de PCA foram incubadas a 22-25°C durante 48-72 horas. Após este tempo de incubação, procedeu-se, nas placas de PCA, à contagem do número total de colónias, bem como do número de colónias de cada um dos tipos morfológicos presentes. Estas contagens realizaram-se naquelas placas que possuem entre 30 e 300 colónias.

Seguidamente, efectuou-se o isolamento de uma colónia representativa de cada um dos tipos morfológicos encontrados, repicando-a para uma placa de PCA até à obtenção de uma cultura pura.

3.4.2 Shotts-Waltman

Nas placas de SW, são efectuadas as contagens do número total de colónias presentes e do número de colónias de cor verde (sacarose negativa), oxidase negativas e apresentando um halo de precipitação do Tween 80 (presumíveis *Y. ruckeri*). A característica distintiva do meio SW é-lhe conferido pela capacidade da *Y. ruckeri* hidrolizar o Tween 80 e pela sua incapacidade de fermentar a sacarose.

As placas de SW foram incubadas a 22-25°C durante 48-72 horas. Todas estas colónias foram isoladas, procedendo-se posteriormente à sua identificação. Todas as estirpes bacterianas isoladas foram conservadas, a 15°C, em Motility Stock Medium.

Tabela 1- Composição dos meios de cultura preparados por componentes (quantidades necessárias para preparar 1 litro de cada um dos meios).

Motility Stock Medium	SW
Bacto-casitona 10g	Tryptona 2g
Extracto de levedura 3g	Extracto de levedura 2g
NaCl 5g	NaCl 5g
Agar 3g	CaCl ₂ .2H ₂ O 0,1g
	Agar 15g
	Azul de bromo thymol 0,03g
	Tween 80 (polyoxtethylene sorbitan mono-oleate Sigma P1754) 10ml
	Sacarose (0,5g/ml) 10ml

3.5 Caracterização Fenotípica

Uma vez obtidas as culturas puras, será feita a caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica das bactérias isoladas, utilizando os sistemas miniturizados API

20E e API 20NE (bioMérieux) e os seguintes métodos convencionais (Austin & Allen-Austin, 1993; Board *et al.*, 1992; Romalde, 1992; Smibert & Krieg, 1994):

1. Forma/Mobilidade

Observação directa ao microscópio (ampliação 400X – 1000X) de uma gota de uma cultura em fase exponencial em soro fisiológico, regista-se a mobilidade/imobilidade e a respectiva forma.

2. Reacção Gram

Por espalhamento de uma pequena porção de uma cultura em meio sólido sobre uma gota de KOH a 3% (método de Buck, 1982) regista-se as culturas que apresentam viscosidade, como Gram –, e as bactérias que não apresentam viscosidade quando misturadas com o KOH a 3%, como Gram + .

3. Oxidase

Colocando uma porção de uma colónia bem isolada, proveniente de uma cultura fresca em placa, sobre papel de filtro previamente impregnado com uma solução aquosa a 1% de tetrametil-p-fenilenediamina. O desenvolvimento imediato (menos de 10-15 segundos) de uma coloração violeta indica a presença da enzima citocromo-oxidase (reacção positiva);

4. Catalase

Recolhendo, com um instrumento não metálico, uma colónia, bem isolada, de uma cultura fresca da bactéria e suspendendo-a em peróxido de hidrogénio (H₂O₂) a 3% numa placa de Petri esterilizada. A formação de bolhas gasosas é indicadora da presença da enzima;

5. Oxidação/Fermentação (O/F)

Utilizando o meio basal de Hugh & Leifson (Smibert & Krieg, 1994) (Difco), suplementado com glucose a uma concentração final de 1%. Cada estirpe bacteriana é inoculada em dois tubos com este meio semi-sólido, com uma pipeta Pasteur, sendo um deles colocado em condições de anaerobiose através da deposição de uma camada (cerca de 1cm de espessura) de parafina líquida estéril. Também serão incubados dois tubos controle: um com o mesmo meio, mas sem glucose; o segundo, contendo a glucose, mas não tendo sido inoculado com a bactéria.

Após o período de incubação, os resultados serão interpretados do seguinte modo: a) se apenas o tubo sem parafina estiver acidificado (cor amarela), o metabolismo da bactéria será considerado como sendo oxidativo (reação O); b) se ambos os tubos desenvolverem a cor amarela (sofrerem acidificação), então a bactéria será considerada como sendo capaz de fermentar o açúcar (reação F); c) se nenhum dos tubos se encontrar acidificado, a bactéria será considerada como sendo incapaz de catabolizar a glucose.

6. Descarboxilação de Aminoácidos

Utilizando o meio base de Moeller (Smibert & Krieg, 1994), conjuntamente com os aminoácidos L-arginina, L-lisina e L-ornitina a uma concentração final de 1%. A presença de turvação, acompanhada de alcalinização do meio, após um período de 48 horas a 22-25°C (em anaerobiose) indicam a presença das enzimas arginina-deidrolase, lisina-descarboxilase e ornitina-descarboxilase respectivamente.

Capítulo 4.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Na tabela 2 encontram-se resumidos os valores das contagens do número total de unidades formadoras de colónias encontrados na água e sedimento ao longo das amostragens mensais.

Tabela 2- Números totais de Unidades Formadoras de Colónias encontradas durante todo o período de amostragens. Estes resultados estão expressos em UFC x 10³ bactérias/ml no caso da água e em UFC x 10³ bactérias/g no caso do sedimento. O tracejado na tabela significa placas contaminadas com fungos, nas quais, não foi possível fazer uma contagem do número de UFC.

	PONTO 1		PONTO 2		PONTO 3	
	Água	Sedim.	Água	Sedim.	Água	Sedim.
Setembro 99	--	154	6,7	376	7,8	59,5
Outubro	2,1	32	2,5	955	2,2	380
Novembro	3,4	--	20,5	192	--	10,2
Dezembro	1	50	25,3	57	0,8	33
Janeiro	0,4	--	1	--	1,1	--
Fevereiro	0,9	24	1,6	--	0,7	--
Março	0,8	93,8	0,9	184,5	1,8	720
Maió	2,5	164	2,3	207,5	3,1	401,5
Junho	0,9	68	3,1	--	3,3	245
Julho	4,1	404,5	4,9	540,5	15,6	670
Agosto	4,3	235	40,3	--	4,3	--
Setembro 00	3,3	240,8	38,5	607	5	374

Como se pode verificar pela análise da tabela 2, os números totais de unidades formadoras de colónias encontradas no sedimento são largamente superiores aos encontrados na água.

Podendo observar-se uma grande variabilidade nos resultados, uma análise mais detalhada a estes, pode-nos revelar alguns dados importantes para o nosso estudo. Como é o caso do número superior de bactérias viáveis contadas à saída da truticultura (ponto 2), no sedimento em relação aos outros dois pontos de amostragem. Na água, também se registou uma tendência para o aumento do número de bactérias à saída do efluente da truticultura, particularmente quando comparados com as contagens no ponto 1. No entanto, existem resultados dissonantes em relação a este padrão, como o ocorrido no mês de Julho na água em que a contagem foi claramente superior no ponto 3, situado a 1,5km a jusante da truticultura, em relação aos outros dois pontos de amostragem.

Também se regista nas amostras de Março e Maio uma quantidade superior do número de bactérias no ponto 3 em relação ao ponto 2 no sedimento e na água, um facto com algum relevo já que a tendência geral é a do número superior de bactérias no ponto 2 em relação aos outros dois locais de amostragem do sedimento.

Nota-se, ainda pela análise da tabela 2 um abaixamento do número de bactérias viáveis na água durante os meses de inverno (Dezembro, Janeiro, Fevereiro, Março), com a excepção da colheita no ponto 2 no mês de Dezembro, que apresenta um valor algo elevado e da colheita de Junho no ponto 1, que apresenta um valor semelhante aos encontrados no Inverno.

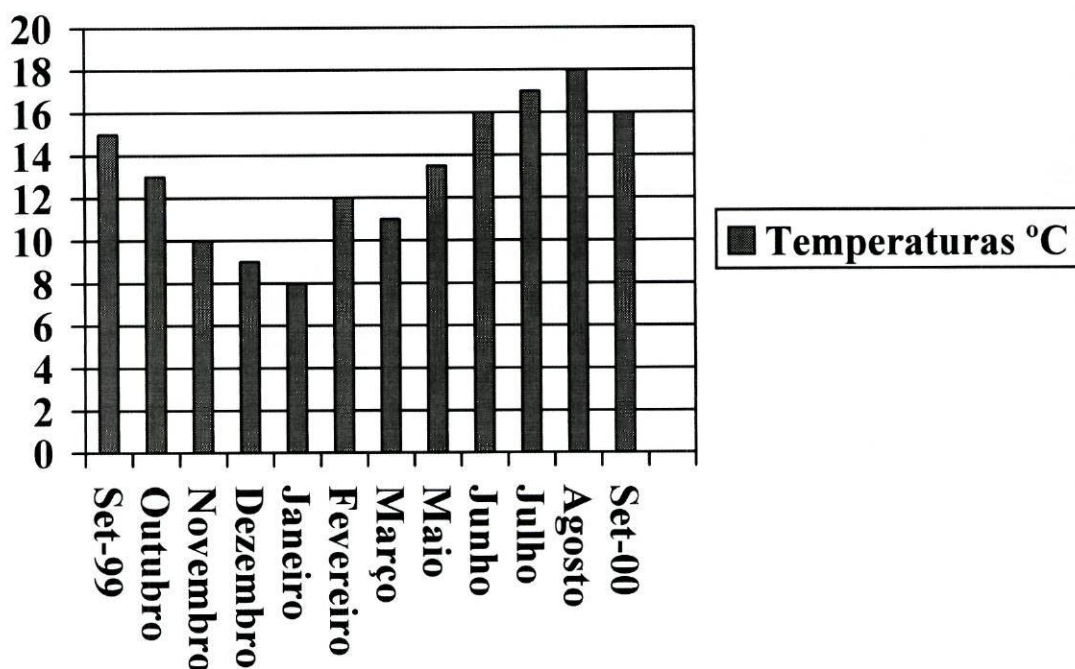


Gráfico 1 – Temperaturas verificadas ao longo do ano na água do rio

As contagens mais elevadas no ponto 1 foram obtidas, no sedimento, no mês de Julho (4×10^5 UFC/g) e na água durante os meses de Julho ($4,1 \times 10^3$ UFC/ml) e Agosto ($4,3 \times 10^3$ UFC/ml), coincidentes com os meses de temperatura mais elevada (Figura 1).

No ponto 2, a contagem mais elevada na água foi obtida durante o mês de Agosto (4×10^4 UFC/ml), e no sedimento durante o mês de Outubro ($9,5 \times 10^5$ UFC/g).

No mês de Julho foi obtido o valor mais elevado na água no ponto 3 ($1,6 \times 10^4$ UFC/ml), enquanto que no sedimento deste ponto, as contagens de Março ($7,2 \times 10^5$ UFC/g) e de Julho ($6,7 \times 10^5$ UFC/g) são as mais elevadas.

Nas tabelas 3 a 14 encontram-se resumidos os grupos bacterianos detectados na água e no sedimento nos 3 locais de amostragem ao longo do período de estudo de Setembro de 1999 a Setembro de 2000 e a respectiva percentagem.

Na tabela 3 referente à amostragem de Setembro de 1999, podemos observar uma predominância generalizada de *Aeromonas* nos 3 pontos de amostragem, somente

interrompida no ponto 3 na água, onde também as *Enterobacteriaceae* predominam. A predominância de *Aeromonas* é mais significativa na água à saída da truticultura (ponto 2). Encontra-se também presente uma quantidade apreciável de *Flavobacterium* no sedimento do ponto 3.

Na tabela 4, na amostragem referente a Outubro, podemos verificar uma predominância do grupo *Staphylococcus-Streptococcus* no sedimento do ponto 1 e do ponto 3 e de *Aeromonas* no ponto 2, significativa é, ainda, a presença de Bacilos Gram + no sedimento.

Na água, nota-se uma predominância repartida entre os Bacilos Gram + e as *Aeromonas* no ponto 1 e no ponto 3 e uma predominância acentuada de Bacilos Gram + na água do ponto 2.

Na tabela 5 na amostragem de Novembro, podemos verificar a existência de predominância das *Pseudomonas* em todas as amostras e uma quantidade assinalável de *Aeromonas* no ponto 2 no sedimento. No ponto 1 no sedimento e no ponto 3 água não foi possível produzir uma contagem válida do número de colónias.

Na tabela 6, na amostra do mês de Dezembro, encontramos uma predominância de *Pseudomonas* nas amostras de sedimento e de *Aeromonas* na água.

Em Janeiro (tabela 7) predominam as *Aeromonas*, no ponto 1 e no ponto 3 no sedimento, e o *Flavobacterium* e *Aeromonas* no ponto 2. Na água, no ponto 1 e no ponto 2 predominam as *Aeromonas*, no ponto 2 existe também uma quantidade assinalável de Bacilos Gram + e no ponto 3 de *Pseudomonas*.

Na tabela 8 durante o mês de Fevereiro, detectou-se uma predominância de *Pseudomonas* no sedimento do ponto 1. As placas de PCA contendo inóculos do sedimento do ponto 2 e do ponto 3 encontravam-se contaminadas por fungos, razão pela qual não foi possível efectuar contagens e isolamentos em alguns locais ao longo do período de amostragens.

No ponto 1 e no ponto 3 na água, o grupo mais abundante foi as *Aeromonas*, no ponto 1 existe também uma grande percentagem de *Enterobacteriaceae*. No ponto 2 na água existe uma predominância indiscutível de *Enterobacteriaceae* (81,2%).

Na tabela 9 encontram-se resumidos os tipos bacterianos encontrados durante o mês de Março e a sua abundância relativa, através da tabela notamos um acentuado domínio de *Enterobacteriaceae* na água. Enquanto que no sedimento, o domínio é do grupo *Acinetobacter-Moraxella* no ponto 1, de *Flavobacterium* e *Aeromonas* no ponto 2 e de *Aeromonas* e *Enterobacteriaceae* no ponto 3.

Na tabela 10 encontram-se os grupos bacterianos encontrados durante o mês de Maio, durante este mês detectou-se um domínio de *Aeromonas* na água no ponto 2 e no ponto 3. No ponto 1 as *Aeromonas* existem em igual quantidade com o grupo *Staphylococcus-Streptococcus*.

No sedimento o domínio é repartido entre o grupo dos Bacilos Gram + e das *Enterobacteriaceae*, sendo este último mais abundante no ponto 2 e no ponto 3 e o primeiro no ponto 1.

Na tabela 11, na amostragem do mês de Junho, ocorreu um domínio generalizado de *Aeromonas* tanto na água como no sedimento.

Nota-se, pela análise da tabela 12 uma dominância de *Pseudomonas* no sedimento, embora com efectivos importantes de *Aeromonas*.

Na água, distingue-se uma dominância de *Flavobacterium* no ponto 1 e 3 e de *Aeromonas* no ponto 2.

Na amostragem de Agosto (tabela 13), no ponto 1 no sedimento, encontramos uma predominância de *Aeromonas* e de Bacilos Gram +, e de *Pseudomonas* no ponto 3. No ponto 2, não foi possível proceder à contagem e isolamento de bactérias. No ponto 1 na água verificamos existir um domínio de *Pseudomonas*, e de *Aeromonas* e *Pseudomonas* nos pontos 2 e 3.

Na tabela 14, na amostragem referente ao mês de Setembro de 2000 no sedimento do ponto 1 e 3, predominam as *Aeromonas* e no ponto 2 as *Pseudomonas*. Embora se note, uma quantidade significativa de *Pseudomonas* no ponto 1 no sedimento.

Na água, nota-se uma dominância acentuada de *Pseudomonas* no ponto 1, e uma dominância ligeira de *Aeromonas* no ponto 2 sobre as *Enterobacteriaceae*, e de *Enterobacteriaceae* sobre as *Aeromonas* no ponto 3.

Apesar de se ter utilizado um meio de cultura próprio para a sua detecção (SW), algumas presumíveis *Yersinia ruckeri* detectadas, vieram através dos testes API 20E, a revelar-se como espécies pertencentes aos géneros *Enterobacter*, *Serratia* e *Kluyvera*. Entre as bactérias presumivelmente *Yersinia ruckeri*, foram encontradas diversas *Enterobacteriaceae* entre elas *Serratia marcescens* (API20E: 5317561), *Enterobacter aerogenes* (API20E: 5305573) e *Kluyvera* spp.(API20E: 5344573).

Tabela 3 – Grupos bacterianos detectados e respectivas percentagens na amostragem do mês de Setembro de 1999. P1S-Sedimento do ponto 1, P2S-Sedimento do ponto 2, P3S-Sedimento do ponto 3, P1A- Água do ponto 1, P2A-Água do ponto 2, P3A-Água do ponto 3.

Local de Amostragem	Grupos bacterianos detectados (percentagem)
P1S	<i>Aeromonas</i> (58,8%)
	<i>Pseudomonas</i> (6,3%)
	<i>Flavobacterium</i> (5,4%)
	<i>Acinetobacter-Moraxella</i> (3,6%)
	<i>Enterobacteriaceae</i> (3,4%)
	Outras (não identificadas) (22,5%)
P2S	<i>Aeromonas</i> (65,8%)
	<i>Flavobacterium</i> (14,2%)
	<i>Enterobacteriaceae</i> (12%)
	<i>Pseudomonas</i> (0,7%)
	Outras (não identificadas) (7,3%)
P3S	<i>Aeromonas</i> (63,8%)
	<i>Flavobacterium</i> (27,7%)
	<i>Staphylococcus-Streptococcus</i> (3,4%)
	Outras (não identificadas) (5,1%)
P1A	---
P2A	<i>Aeromonas</i> (78,4%)
	<i>Flavobacterium</i> (9%)
	<i>Staphylococcus-Streptococcus</i> (2,2%)
	Outras (não identificadas) (10,4%)
P3A	<i>Enterobacteriaceae</i> (31%)
	<i>Aeromonas</i> (29%)
	<i>Flavobacterium</i> (13,5%)
	<i>Staphylococcus-Streptococcus</i> (7,7%)
	<i>Acinetobacter-Moraxella</i> (6,5%)
	<i>Chromobacterium</i> (0,6%)
	Outras (não identificadas) (11,7%)

Tabela 4- Grupos bacterianos detectados e respectivas percentagens na amostragem do mês de Outubro de 1999. P1S-Sedimento do ponto 1, P2S-Sedimento do ponto 2, P3S-Sedimento do ponto 3, P1A- Água do ponto 1, P2A-Água do ponto 2, P3A-Água do ponto 3.

Local de Amostragem	Grupos bacterianos detectados (percentagem)
P1S	<i>Staphylococcus-Streptococcus</i> (37,5%)
	Bacilos Gram + (18,8%)
	<i>Pseudomonas</i> (12,5%)
	<i>Aeromonas</i> (12,5%)
	<i>Acinetobacter-Moraxella</i> (12,5%)
	Outras (não identificadas) (6,2%)
P2S	<i>Aeromonas</i> (46%)
	Bacilos Gram + (24,8%)
	<i>Staphylococcus-Streptococcus</i> (11,8%)
	Outras (não identificadas) (17,4%)
P3S	<i>Staphylococcus-Streptococcus</i> (40,8%)
	Bacilos Gram + (22,4%)
	<i>Aeromonas</i> (11,8%)
	<i>Acinetobacter-Moraxella</i> (10,5%)
	Outras (não identificadas) (14,5%)
P1A	<i>Aeromonas</i> (30%)
	Bacilos Gram + (29,4%)
	<i>Pseudomonas</i> (13,4%)
	<i>Staphylococcus-Streptococcus</i> (8,5%)
	<i>Enterobacteriaceae</i> (6,8%)
	Outras (não identificadas) (11,9%)
P2A	Bacilos Gram + (51,5%)
	<i>Aeromonas</i> (16,8%)
	<i>Enterobacteriaceae</i> (12,3%)
	<i>Staphylococcus-Streptococcus</i> (10,8%)
	Outras (não identificadas) (8,6%)
P3A	Bacilos Gram + (39,3%)
	<i>Aeromonas</i> (34,4%)
	<i>Pseudomonas</i> (1,8%)
	<i>Staphylococcus-Streptococcus</i> (1,8%)
	<i>Enterobacteriaceae</i> (1,4%)
	<i>Flavobacterium</i> (0,7%)
	Outras (não identificadas) (20,6%)

Tabela 5- Grupos bacterianos detectados e respectivas percentagens na amostragem do mês de Novembro de 1999. P1S-Sedimento do ponto 1, P2S-Sedimento do ponto 2, P3S-Sedimento do ponto 3, P1A- Água do ponto 1, P2A-Água do ponto 2, P3A-Água do ponto 3.

Local de Amostragem	Grupos bacterianos detectados (percentagem)
P1S	---
P2S	<i>Pseudomonas</i> (33,9%) <i>Aeromonas</i> (27,2%) <i>Flavobacterium</i> (9,6%) <i>Micrococcus</i> (2,6%) <i>Staphylococcus-Streptococcus</i> (1,3%) Outras (não identificadas) (25,4%)
P3S	<i>Pseudomonas</i> (61,8%) <i>Flavobacterium</i> (16,7%) <i>Aeromonas</i> (4,9%) <i>Staphylococcus-Streptococcus</i> (4,9%) <i>Micrococcus</i> (1,9%) Outras (não identificadas) (9,8%)
P1A	<i>Pseudomonas</i> (41,1%) <i>Flavobacterium</i> (19,1%) <i>Aeromonas</i> (5,9%) <i>Micrococcus</i> (5,9%) <i>Staphylococcus-Streptococcus</i> (2,9%) Outras (não identificadas) (25,1%)
P2A	<i>Pseudomonas</i> (61,9%) <i>Aeromonas</i> (6,8%) <i>Flavobacterium</i> (4,1%) <i>Acinetobacter- Moraxella</i> (3,9%) <i>Micrococcus</i> (2,6%) Outras (não identificadas) (20,7%)
P3A	---

Tabela 6- Grupos bacterianos detectados e respectivas percentagens na amostragem do mês de Dezembro de 1999. P1S-Sedimento do ponto 1, P2S-Sedimento do ponto 2, P3S-Sedimento do ponto 3, P1A- Água do ponto 1, P2A-Água do ponto 2, P3A-Água do ponto 3.

Local de Amostragem	Grupos bacterianos detectados (percentagem)
P1S	<i>Pseudomonas</i> (68%)
	<i>Aeromonas</i> (7%)
	<i>Enterobacteriaceae</i> (8%)
	<i>Acinetobacter-Moraxella</i> (4%)
	<i>Staphylococcus-Streptococcus</i> (1%)
	Bacilos Gram + (4%)
	Outras (não identificadas) (8%)
P2S	<i>Pseudomonas</i> (59,6%)
	<i>Aeromonas</i> (5,3%)
	<i>Enterobacteriaceae</i> (5,3%)
	<i>Acinetobacter-Moraxella</i> (5,3%)
	Bacilos Gram + (3,5%)
	Outras (não identificadas) (21%)
P3S	<i>Pseudomonas</i> (57,6%)
	<i>Acinetobacter-Moraxella</i> (18,2%)
	Bacilos Gram + (6%)
	Outras (não identificadas) (18,2%)
P1A	<i>Aeromonas</i> (45,2%)
	<i>Pseudomonas</i> (32,2%)
	<i>Enterobacteriaceae</i> (2,9%)
	Bacilos Gram + (1%)
	Outras (não identificadas) (18,7%)
P2A	<i>Aeromonas</i> (71,4%)
	<i>Pseudomonas</i> (18,9%)
	Outras (não identificadas) (9,7%)
P3A	<i>Aeromonas</i> (53,4%)
	<i>Pseudomonas</i> (29,2%)
	Outras (não identificadas) (17,4%)

Tabela 7- Grupos bacterianos detectados e respectivas percentagens na amostragem do mês de Janeiro de 2000. P1S-Sedimento do ponto 1, P2S-Sedimento do ponto 2, P3S-Sedimento do ponto 3, P1A- Água do ponto 1, P2A-Água do ponto 2, P3A-Água do ponto 3.

Local de Amostragem	Grupos bacterianos detectados (percentagem)
P1S	--
P2S	--
P3S	--
P1A	<i>Aeromonas</i> (54,9%) Bacilos Gram + (19,5%) <i>Pseudomonas</i> (6,1%) <i>Acinetobacter-Moraxella</i> (2,4%) Outras (não identificadas) (17,1%)
P2A	<i>Aeromonas</i> (31,2%) Bacilos Gram + (25,6%) <i>Pseudomonas</i> (14,6%) <i>Acinetobacter- Moraxella</i> (13,6%) Outras (não identificadas) (15%)
P3A	<i>Aeromonas</i> (35,8%) <i>Pseudomonas</i> (26,3%) Bacilos Gram + (18,9%) <i>Acinetobacter- Moraxella</i> (8,8%) Outras (não identificadas) (10,2%)

Tabela 8- Grupos bacterianos detectados e respectivas percentagens na amostragem do mês de Fevereiro de 2000. P1S-Sedimento do ponto 1, P2S-Sedimento do ponto 2, P3S-Sedimento do ponto 3, P1A- Água do ponto 1, P2A-Água do ponto 2, P3A-Água do ponto 3.

Local de Amostragem	Grupos bacterianos detectados (percentagem)
P1S	<i>Pseudomonas</i> (67,9%)
	<i>Acinetobacter-Moraxella</i> (7,1%)
	Outras (não identificadas) (25%)
P2S	--
P3S	--
P1A	<i>Aeromonas</i> (34,7%)
	<i>Enterobacteriaceae</i> (32,9%)
	<i>Pseudomonas</i> (10,4%)
	<i>Flavobacterium</i> (2%)
	<i>Acinetobacter-Moraxella</i> (0,4%)
	Outras (não identificadas) (19,6%)
P2A	<i>Enterobacteriaceae</i> (81,2%)
	<i>Aeromonas</i> (2,8%)
	<i>Flavobacterium</i> (0,6%)
	<i>Acinetobacter-Moraxella</i> (0,5%)
	<i>Pseudomonas</i> (0,4%)
	Bacilos Gram + (0,2%)
	Outras (não identificadas) (14,3%)
P3A	<i>Aeromonas</i> (62%)
	<i>Enterobacteriaceae</i> (24,9%)
	<i>Pseudomonas</i> (1,6%)
	<i>Flavobacterium</i> (0,9%)
	Outras (não identificadas) (10,6%)

Tabela 9- Grupos bacterianos detectados e respectivas percentagens na amostragem do mês de Março de 2000. P1S-Sedimento do ponto 1, P2S-Sedimento do ponto 2, P3S-Sedimento do ponto 3, P1A- Água do ponto 1, P2A-Água do ponto 2, P3A-Água do ponto 3.

Local de Amostragem	Grupos bacterianos detectados (percentagem)
P1S	<i>Acinetobacter-Moraxella</i> (47,7%)
	<i>Flavobacterium</i> (14,4%)
	Bacilos Gram + (8,3%)
	<i>Enterobacteriaceae</i> (5,9%)
	<i>Aeromonas</i> (5,3%)
	Outras (não identificadas) (18,4%)
P2S	<i>Flavobacterium</i> (22,6%)
	<i>Aeromonas</i> (22,3%)
	<i>Acinetobacter-Moraxella</i> (14,8%)
	<i>Enterobacteriaceae</i> (13,1%)
	Bacilos Gram + (5,5%)
	Outras (não identificadas) (21,7%)
P3S	<i>Aeromonas</i> (39,6%)
	<i>Enterobacteriaceae</i> (34,7%)
	<i>Flavobacterium</i> (9,7%)
	Bacilos Gram + (4,2%)
	<i>Acinetobacter-Moraxella</i> (3,5%)
	Outras (não identificadas) (8,3%)
P1A	<i>Enterobacteriaceae</i> (44%)
	<i>Aeromonas</i> (30%)
	Bacilos Gram + (22,7%)
	Outras (não identificadas) (3,3%)
P2A	<i>Enterobacteriaceae</i> (53%)
	Bacilos Gram + (23,8%)
	<i>Aeromonas</i> (21,5%)
	Outras (não identificadas) (1,7%)
P3A	<i>Enterobacteriaceae</i> (55%)
	Bacilos Gram + (19,3%)
	<i>Aeromonas</i> (16%)
	Outras (não identificadas) (9,7%)

Tabela 10- Grupos bacterianos detectados e respectivas percentagens na amostragem do mês de Maio de 2000. P1S-Sedimento do ponto 1, P2S-Sedimento do ponto 2, P3S-Sedimento do ponto 3, P1A- Água do ponto 1, P2A-Água do ponto 2, P3A-Água do ponto 3.

Local de Amostragem	Grupos bacterianos detectados (percentagem)
P1S	Bacilos Gram + (37,8%)
	<i>Enterobacteriaceae</i> (32,9%)
	<i>Aeromonas</i> (16,3%)
	Outras (não identificadas) (13%)
P2S	<i>Enterobacteriaceae</i> (44,8%)
	Bacilos Gram + (35%)
	<i>Aeromonas</i> (5,1%)
	Outras (não identificadas) (15,1%)
P3S	<i>Enterobacteriaceae</i> (41,1%)
	Bacilos Gram + (31%)
	<i>Aeromonas</i> (22,3%)
	Outras (não identificadas) (5,6%)
P1A	<i>Aeromonas</i> (29%)
	<i>Staphylococcus-Streptococcus</i> (29%)
	<i>Enterobacteriaceae</i> (15,6%)
	<i>Acinetobacter-Moraxella</i> (9,7%)
	Outras (não identificadas) (16,7%)
P2A	<i>Aeromonas</i> (75,5%)
	<i>Acinetobacter-Moraxella</i> (18,4%)
	Outras (não identificadas) (6,1%)
P3A	<i>Aeromonas</i> (81,3%)
	<i>Acinetobacter-Moraxella</i> (7,8%)
	<i>Flavobacterium</i> (2,4%)
	Outras (não identificadas) (8,5%)

Tabela 11- Grupos bacterianos detectados e respectivas percentagens na amostragem do mês de Junho de 2000. P1S-Sedimento do ponto 1, P2S-Sedimento do ponto 2, P3S-Sedimento do ponto 3, P1A- Água do ponto 1, P2A-Água do ponto 2, P3A-Água do ponto 3.

Local de Amostragem	Grupos bacterianos detectados (percentagem)
P1S	<i>Aeromonas</i> (61,8%)
	<i>Acinetobacter-Moraxella</i> (11,8%)
	Bacilos Gram + (10,3%)
	Outras (não identificadas) (16,1%)
P2S	---
P3S	<i>Aeromonas</i> (82,5%)
	Bacilos Gram + (4,2%)
	Outras (não identificadas) (13,3%)
P1A	<i>Aeromonas</i> (61,8%)
	<i>Enterobacteriaceae</i> (20,2%)
	Outras (não identificadas) (18%)
P2A	<i>Aeromonas</i> (67,1%)
	<i>Enterobacteriaceae</i> (14,2%)
	<i>Flavobacterium</i> (0,8%)
	Bacilos Gram + (1%)
	Outras (não identificadas) (16,9%)
P3A	<i>Aeromonas</i> (72,5%)
	<i>Enterobacteriaceae</i> (16,6%)
	<i>Flavobacterium</i> (0,8%)
	Outras (não identificadas) (10,1%)

Tabela 12- Grupos bacterianos detectados e respectivas percentagens na amostragem do mês de Julho de 2000. P1S-Sedimento do ponto 1, P2S-Sedimento do ponto 2, P3S-Sedimento do ponto 3, P1A- Água do ponto 1, P2A-Água do ponto 2, P3A-Água do ponto 3.

Local de Amostragem	Grupos bacterianos detectados (percentagem)
P1S	<i>Pseudomonas</i> (49,6%)
	<i>Aeromonas</i> (31,1%)
	Outras (não identificadas) (19,3%)
P2S	<i>Pseudomonas</i> (50,1%)
	<i>Aeromonas</i> (31,4%)
	<i>Enterobacteriaceae</i> (13,9%)
	Outras (não identificadas) (4,6%)
P3S	<i>Pseudomonas</i> (49,3%)
	<i>Aeromonas</i> (20,9%)
	<i>Enterobacteriaceae</i> (10,4%)
	Outras (não identificadas) (19,4%)
P1A	<i>Flavobacterium</i> (31,2%)
	<i>Enterobacteriaceae</i> (12,6%)
	<i>Lactobacillus</i> (9%)
	<i>Aeromonas</i> (7,3%)
	<i>Acinetobacter-Moraxella</i> (2,5%)
	Outras (não identificadas) (7,9%)
P2A	<i>Aeromonas</i> (34,1%)
	<i>Enterobacteriaceae</i> (22,5%)
	<i>Flavobacterium</i> (13%)
	<i>Pseudomonas</i> (12,6%)
	<i>Lactobacillus</i> (7,6%)
	Outras (não identificadas) (10,2%)
P3A	<i>Flavobacterium</i> (35,7%)
	<i>Aeromonas</i> (21%)
	<i>Enterobacteriaceae</i> (16,9%)
	<i>Pseudomonas</i> (14,8%)
	Outras (não identificadas) (11,6%)

Tabela 13- Grupos bacterianos detectados e respectivas percentagens na amostragem do mês de Agosto de 2000. P1S-Sedimento do ponto 1, P2S-Sedimento do ponto 2, P3S-Sedimento do ponto 3, P1A- Água do ponto 1, P2A-Água do ponto 2, P3A-Água do ponto 3.

Local de Amostragem	Grupos bacterianos detectados (percentagem)
P1S	<i>Aeromonas</i> (25%)
	Bacilos Gram + (20,8%)
	<i>Pseudomonas</i> (16,7%)
	<i>Acinetobacter-Moraxella</i> (12,5%)
	<i>Flavobacterium</i> (8,3%)
	<i>Micrococcus</i> (4,2%)
	Outras (não identificadas) (12,5%)
P2S	--
P3S	<i>Pseudomonas</i> (57,3%)
	<i>Aeromonas</i> (13,6%)
	Bacilos Gram + (10,9%)
	<i>Micrococcus</i> (2,7%)
	Outras (não identificadas) (15,5%)
P1A	<i>Pseudomonas</i> (47,9%)
	<i>Aeromonas</i> (36,1%)
	<i>Enterobacteriaceae</i> (3,6%)
	Outras (não identificadas) (12,4%)
P2A	<i>Aeromonas</i> (44,2%)
	<i>Pseudomonas</i> (37,8%)
	Bacilos Gram + (3,7%)
	<i>Enterobacteriaceae</i> (3,6%)
	Outras (não identificadas) (10,7%)
P3A	<i>Aeromonas</i> (37,3%)
	<i>Pseudomonas</i> (33,6%)
	<i>Enterobacteriaceae</i> (16,2%)
	<i>Acinetobacter-Moraxella</i> (3,6%)
	Bacilos Gram + (2,4%)
	Outras (não identificadas) (6,9%)

Tabela 14- Grupos bacterianos detectados e respectivas percentagens na amostragem do mês de Setembro de 2000. P1S-Sedimento do ponto 1, P2S-Sedimento do ponto 2, P3S-Sedimento do ponto 3, P1A- Água do ponto 1, P2A-Água do ponto 2, P3A-Água do ponto 3.

Local de Amostragem	Grupos bacterianos detectados (percentagem)
P1S	<i>Aeromonas</i> (46,8%)
	<i>Pseudomonas</i> (34,7%)
	<i>Lactobacillus</i> (4,8%)
	Outras (não identificadas) (18,4%)
P2S	<i>Pseudomonas</i> (54,8%)
	<i>Aeromonas</i> (25,3%)
	<i>Lactobacillus</i> (15,3%)
	Outras (não identificadas) (4,6%)
P3S	<i>Aeromonas</i> (60,3%)
	<i>Pseudomonas</i> (21,7%)
	<i>Lactobacillus</i> (4,3%)
	Outras (não identificadas) (8,3%)
P1A	<i>Pseudomonas</i> (73,8%)
	<i>Flavobacterium</i> (4,6%)
	<i>Acinetobacter-Moraxella</i> (4,6%)
	<i>Enterobacteriaceae</i> (3,1%)
	<i>Aeromonas</i> (3,1%)
	Outras (não identificadas) (10,8%)
P2A	<i>Aeromonas</i> (46,8%)
	<i>Enterobacteriaceae</i> (43,2%)
	<i>Flavobacterium</i> (1,6%)
	Outras (não identificadas) (8,4%)
P3A	<i>Enterobacteriaceae</i> (44%)
	<i>Aeromonas</i> (42%)
	<i>Pseudomonas</i> (2%)
	<i>Flavobacterium</i> (2%)
	Outras (não identificadas) (10%)

Analisando de uma forma global, quanto aos grupos de bactérias predominantes, a tabela 15 representa as respectivas percentagem anuais de dominância em cada um dos pontos, por tipo de amostragem.

Na água no ponto 1 (P1) encontramos o grupo *Aeromonas* como o mais frequente (54,5%), seguidas do grupo das *Pseudomonas* (27,2%), *Enterobacteriaceae* (9,1%) e *Flavobacterium* (9,1%).

Na saída da truticultura (P2) na água os grupos dominantes foram *Aeromonas* (66,7%); *Enterobacteriaceae* (16,7%), Bacilos Gram + (8,3%) e *Pseudomonas* (8,3%).

A jusante da truticultura (P3) na água dominaram *Aeromonas* (54,5%); *Enterobacteriaceae* (27,2%), Bacilos Gram + (9,1%) e *Flavobacterium* (9,1%).

No sedimento, a montante da truticultura (P1) predominaram *Aeromonas* (45,4%), *Pseudomonas* (27,3%), *Staphylococcus-Streptococcus* (9,1%), *Acinetobacter-Moraxella* (9,1%) e Bacilos Gram + (9,1%).

Na saída da truticultura (P2) no sedimento predominaram *Pseudomonas* (44,4%), *Aeromonas* (22,2%), *Flavobacterium* (22,2%) e *Enterobacteriaceae* (11,1%).

A jusante da truticultura no sedimento do ponto 3 predominaram *Aeromonas* (45,4%), *Pseudomonas* (36,4%), *Staphylococcus-Streptococcus* (9,1%) e *Enterobacteriaceae* (9,1%).

Tabela 15– Grupos de bactérias predominantes e respectivas percentagens ao longo das amostras anuais. Na tabela encontra-se a razão entre o número de vezes em que determinado grupo foi predominante, sobre o total das amostras em cada um dos locais ao longo do ano.

Amostra	Local	Grupos de bactérias predominantes	Percentagem anual (%)
Água	P1	<i>Aeromonas</i>	54,5
		<i>Pseudomonas</i>	27,2
		<i>Enterobacteriaceae</i>	9,1
		<i>Flavobacterium</i>	9,1
	P2	<i>Aeromonas</i>	66,7
		<i>Enterobacteriaceae</i>	16,7
		<i>Pseudomonas</i>	8,3
		Bacilos Gram +	8,3
	P3	<i>Aeromonas</i>	54,5
		<i>Enterobacteriaceae</i>	27,2
		Bacilos Gram +	9,1
		<i>Flavobacterium</i>	9,1
Sedimento	P1	<i>Aeromonas</i>	45,4
		<i>Pseudomonas</i>	27,3
		<i>Staphylococcus-Streptococcus</i>	9,1
		<i>Acinetobacter-Moraxella</i>	9,1
		Bacilos Gram +	9,1
	P2	<i>Pseudomonas</i>	44,4
		<i>Aeromonas</i>	22,2
		<i>Flavobacterium</i>	22,2
		<i>Enterobacteriaceae</i>	11,1
	P3	<i>Aeromonas</i>	45,4
		<i>Pseudomonas</i>	36,4
		<i>Staphylococcus-Streptococcus</i>	9,1
		<i>Enterobacteriaceae</i>	9,1

Capítulo 5.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

De uma forma geral, os resultados condizem com a bibliografia consultada, nomeadamente no que diz respeito às contagens totais de bactérias viáveis, que se verificou serem superiores no sedimento em relação à água em 1, 2 ou mesmo 3 logaritmos decimais. Para tal, veja-se Guinea *et al* (1979), onde se afirma que se a água superficial apresentar um número total de células da ordem de 10^3 bactérias/ml, a contagem com uma lâmina submergida pode alcançar cifras bastante superiores. Continua o autor dizendo que “estes valores são explicáveis pela importância adaptativa da aderência das bactérias”, que podem aderir às partículas de sedimento e outras estruturas, formando “biofilmes”, onde encontram condições mais favoráveis de vida. Guinea *et al* (1979) refere ainda a importância de se identificar a comunidade microbiota aderida às superfícies, pois se é importante, sob o ponto de vista sanitário, controlar as bactérias transportadas pela água, não é menos importante situar as características da comunidade microbiota autóctone identificando as bactérias aderidas às superfícies, o que, se assim não fosse, levaria a uma subestimação tanto da variedade como do número de células bacterianas envolvidas no ecossistema.

O maior número de células bacterianas encontradas no sedimento, pode resultar também, do aumento de matéria orgânica existente no sedimento em relação à água, o que resulta num aumento de nutrientes disponíveis para a reprodução das bactérias.

Tal como em Cahill (1990), uma variação sazonal foi notada neste trabalho, no número de bactérias viáveis isoladas ao longo do ano, tendo aumentado da Primavera para o Verão e diminuído no Inverno, sem no entanto, existir um padrão muito nítido.

Dos resultados (tabela 2), nota-se uma tendência para uma maior densidade bacteriana junto do efluente da truticultura (ponto 2), e uma menor densidade no ponto 1 no rio, na entrada da água para a instalação de aquacultura. No ponto 3 verifica-se uma contagem total de bactérias viáveis intermédia entre aquelas do ponto 1 e do ponto 2.

Uma possível explicação para o facto de existir um aumento do número de bactérias nomeadamente na Primavera pode estar relacionado com o caudal do rio, que nessa altura do ano se encontrava no seu valor médio. Na altura em que se dá a transição dos caudais máximos para os médios com a diminuição da pluviosidade, ocorreu um transporte de bactérias e material orgânico das margens e dos tributários do rio e uma diminuição do efeito de diluição, com a conseqüente concentração das bactérias existentes no rio.

Verifica-se também, existir alguns picos no número de bactérias nos meses de Outono, por exemplo em Outubro e nos meses de Setembro de 1999 e Setembro de 2000, o que pode estar relacionado com as bactérias heterotróficas, que decompõem matéria orgânica e podem ter aumentado nessa altura do ano devido à queda de folhas das árvores das margens do rio.

A explicação que julgo ser mais razoável acerca da diferença nos dados das amostras de Setembro de 1999 e Setembro de 2000 onde não se constatou uma concordância de valores no número de bactérias encontradas e, de igual forma, verificou-se existir na composição das comunidades encontradas diferenças significativas, reside provavelmente no facto de que as bactérias não provêm de um único ponto de contaminação microbiológica do rio, que neste caso é a truticultura, mas têm antes, uma origem difusa ao longo do rio, por este atravessar uma região onde existem povoações e muita agricultura e silvicultura.

Provavelmente a variabilidade existente nos resultados das contagens totais de bactérias (tabela 2), é conseqüência principalmente do elevado dinamismo do ecossistema lótico e da elevada taxa reprodutiva das bactérias, bem como da temperatura e presença ocasional de poluição.

O grupo bacteriano *Aeromonas* foi o mais frequentemente detectado quer a montante, quer a jusante do ponto de descarga do efluente, com a excepção, difícil de explicar, do sedimento do ponto 2, local onde predominou o *Pseudomonas*. Em contraste, apesar das espécies pertencentes à família *Enterobacteriaceae* terem predominado na água, em alguns meses do ano, em todos os locais de amostras

seleccionados, tal não aconteceu no sedimento onde nunca predominaram a montante da truticultura. Na água, o seu número foi sempre superior nos pontos de amostragem a jusante do que a montante, podendo indiciar algum impacto da truticultura no meio ambiente, através da ampliação do número de Enterobactérias.

O inesperado predomínio de *Pseudomonas* no sedimento do ponto 2, talvez se deva à natureza do material amostrado, que neste local era constituído por partículas com dimensões um pouco superiores às dos outros dois locais de amostragem (por ser localizado perto da parte superior de uma queda de água, onde se forma algum turbilhão). Entre as partículas do sedimento neste local, fica retida uma maior quantidade de ar do que nos outros locais, criando assim um ambiente mais favorável ao desenvolvimento de bactérias oxidativas como é o caso das *Pseudomonas*.

A tendência para um aumento do número de bactérias no rio, junto ao efluente das aquaculturas, é um facto geralmente aceite pela maioria dos investigadores, embora as consequências deste aumento sejam discutíveis. Para Fidalgo (1992), que realizou estudos para determinar o impacto de truticulturas no número de bactérias em rios do norte de Portugal, via coliformes fecais, *Streptococcus* fecais e bactérias heterotróficas totais, não comprovou o efeito das mesmas no desenvolvimento das populações bacterianas, apesar de ter salientado a necessidade do acompanhamento da truticultura e da sua relação com a massa de água.

Também Austin e Allen-Austin (1985) não encontraram mudanças significativas nas populações bacterianas de duas salmoniculturas analisadas. As contagens eram geralmente mais elevadas na água do efluente do que à entrada da instalação, mas estavam dentro dos limites normalmente associados com a água doce.

Podemos, mesmo assim, assumir que as descargas orgânicas provenientes das truticulturas estimulam a concentração e a produção de bactérias no sedimento e na água, embora exista pouco trabalho de investigação publicado acerca desta matéria. A acumulação de matéria orgânica no sedimento junto das truticulturas pode levar ao aumento da mineralização e dos níveis de nutrientes causado pela proliferação de

bactérias heterotróficas e proteolíticas, com o conseqüente aumento do número de blooms fitoplânctônicos (Penczak *et al*, 1982).

Não se verificaram grandes oscilações qualitativas no tipo de bactérias predominantes encontradas nos 3 pontos de amostragens. Tal como em Nieto *et al* (1984), na água junto do efluente da truticultura nota-se uma maior tendência para o aparecimento de bactérias fermentativas, normalmente associadas com as águas de cultura de trutas e com o trato digestivo destas. No entanto, no sedimento do mesmo local, tal tendência não foi registada.

Verifica-se, tal como Nieto *et al* (1984) num trabalho onde foi estudada a água antes da entrada em truticulturas na Galiza, serem os grupos *Pseudomonas* e *Aeromonas* os grupos predominantes, tendo sido também isolados *Enterobacteriaceae* e *Flavobacterium* em alguns meses. Tal tendência foi também verificada neste estudo, e generalizada para a água e sedimento da saída da truticultura, e também nas amostras a jusante no rio. Nestes 3 locais foi possível verificar uma presença ubíqua dos grupos *Aeromonas* e *Pseudomonas*, enquanto que os restantes grupos se limitam a uma presença menos expressiva e limitada a alguns meses.

No sedimento a montante e a jusante (pontos 1 e 3) da truticultura verifica-se uma coincidência do tipo de bactérias predominantes, indicando existir populações bacterianas estabelecidas naquele meio no rio, e que, passada a perturbação causada pela truticultura, os mecanismos de auto-depuração do rio encarregam-se de repor as características iniciais do mesmo, pelo menos qualitativamente, já que, no que diz respeito ao número de bactérias, o rio, corrente abaixo, vai sofrendo um aporte de materiais e de nutrientes, que juntamente com as bactérias são arrastados em direcção à foz, causando assim um aumento do número de bactérias crescente no sentido desta (Clapés, 1969; Guinea *et al*, 1979).

Assim, verifica-se pela análise da tabela 2, que durante os meses de Primavera ocorreu um aumento acentuado do número de bactérias viáveis no ponto 3, comparativamente aos outros dois pontos, o que poderá ser explicado pela menor taxa

de renovação da água nesses meses, traduzindo-se num acréscimo gradual de nutrientes no rio em direcção à foz.

De notar, também, o predomínio em alguns meses nos pontos 1 e 3, de cocos Gram +, fermentativos do grupo *Staphylococcus/Streptococcus*, de bacilos Gram + e de estirpes do grupo *Enterobacteriaceae* tanto no sedimento como na água, o que poderá significar uma degradação da qualidade da água (Nieto *et al*, 1984), proveniente de aglomerados populacionais ou de actividades agrícolas, que poderão colocar em situação de stress aumentado, as populações de trutas cultivadas naquele local, despoletando assim o aparecimento de mortalidades.

Nas amostras ambientais colhidas durante o ano em que se realizou este estudo não se isolaram bactérias, como *Yersinia ruckeri* ou *Aeromonas salmonicida*. Vários autores, no entanto, referem a dificuldade em isolar o agente etiológico da doença da furunculose como (Roberts, 1985; Austin e Austin, 1993). (Roberts, 1985) indica que, apesar de o microorganismo poder ser transferido através da água, em vigilâncias de peixes selvagens à volta de aquaculturas com peixes infectados, não foram detectadas evidências da doença.

Em amostras ambientais, este microorganismo mostrou ser dificilmente isolável, como o refere (Nieto *et al*, 1984) quando afirma que algumas bactérias patogénicas de peixes, entre elas a *Aeromonas salmonicida*, não é geralmente encontrada em água livre de peixes doentes ou portadores saudáveis, e é considerada como patogénica obrigatória.

Determinar a magnitude do impacto de um efluente de uma aquacultura intensiva em águas receptoras é nitidamente um esforço complexo. Porque ao contrário das experiências levadas a cabo em aquários onde as pressões selectivas são diferentes, e onde não existe a predação, que pode alterar a mortalidade devida às doenças (McVicar, 1997); os ecossistemas são multidimensionais, com uma vasta quantidade de factores possíveis de serem examinados; neste caso, os dados raramente são completos. A maior parte dos resultados é aberta a interpretações conflitantes, ou podem, no melhor dos casos, ser ambíguos.

Phillips (1987) indica que a degradação no sedimento de massas de água doce resultantes da cultura intensiva é menos prejudicial para os peixes do que em ambientes marinhos. Taylor e Perrin (1989) concluíram que existem poucas indicações de impacto em peixes selvagens de culturas de salmonídeos em água doce. Algum aumento é de esperar na densidade de peixes à volta das truticulturas de forma a consumir alguma comida não ingerida pelos peixes cultivados. Peixes selvagens são muitas vezes vistos em altas concentrações rodeando as operações das aquaculturas de água doce (Rosenthal *et al*, 1995; Iwama, 1991). Este aumento do número e da biomassa de peixes nas imediações da truticultura pode ser um factor de agravamento e de disseminação de doenças provenientes desta.

Os grupos bacterianos detectadas neste estudo (tabelas 3 a 14), são os observadas em trabalhos similares, estando normalmente presentes no meio aquático, embora o seu número e abundância relativa sofram variações resultantes das influências do meio envolvente ao rio e, também da truticultura. Assim, verificou-se ocorrer algum impacto da piscicultura estudada na perturbação nas comunidades bacterianas autóctones existentes ao longo do rio, nomeadamente no sedimento junto à saída do efluente da truticultura; no entanto, constata-se que o rio em direcção à foz vai corrigindo esse impacto da actividade humana.

Os efeitos do aumento do número de bactérias causado pela truticultura é compensado pela auto-depuração, que repõe os valores normais existentes no rio, para tal contribuindo a orografia dos terrenos atravessados pelo rio, onde se faz sentir um declive acentuado, com inúmeras cascatas de água, que contribuem para a oxigenação da água, impedindo, assim, algum fenómeno de eutrofização mais grave que se possa verificar.

Capítulo 6.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Deste trabalho retiram-se as seguintes conclusões:

- Os grupos bacterianos presentes no rio são os habitualmente encontrados em estudos similares que tratam dos ecossistemas de água doce.
- Os grupos *Aeromonas* e *Pseudomonas* são os mais importantes em termos de números de células bacterianas encontradas no rio.
- As contagens de bactérias aumentaram da Primavera para o Verão e diminuíram para o Inverno.
- O número de bactérias encontradas no sedimento foi superior ao verificado na água, devido essencialmente, à quantidade de matéria orgânica existente nos sedimentos e às propriedades de aderência das bactérias,
- Verificou-se uma tendência para o aumento do número de bactérias junto da saída do efluente da truticultura, comparativamente com os outros dois locais de amostragem.
- No sedimento do rio analisado parece encontrar-se estabelecida uma comunidade bacteriana predominante constituída pelos seguintes grupos, por ordem de importância: *Aeromonas*; *Pseudomonas*, *Staphylococcus-Streptococcus*.
- As bactérias patogénicas de peixes de declaração obrigatória não foram isoladas nas amostras ambientais colhidas ao longo do ano.
- Ocorre no ecossistema estudado algum impacto produzido pela truticultura, traduzido nomeadamente na ampliação do número de bactérias, particularmente enterobactérias, e pela alteração da estrutura da comunidade bacteriana local, porém nota-se pelos resultados obtidos no ponto 3, que esse efeito é compensado pela auto-depuração do rio.

Devido às características de reprodução das bactérias, do elevado dinamismo do rio prospectado e das características da actividade de piscicultura no que diz respeito às descargas do efluente. Fazem-se as seguintes recomendações:

- Analisar um maior número de amostras provenientes do rio e um acompanhamento do impacto da actividade num prazo mais dilatado, de forma a se poder tirar conclusões acerca da extensão desse impacto no funcionamento do ecossistema.
- Investigar o impacto desta indústria nas diferentes componentes ambientais dos sistemas que utiliza, nomeadamente no que se refere às utilizações de antibióticos e de desinfectantes tóxicos.
- Reforçar o estudo do estabelecimento de aquacultura, nomeadamente a análise das taxas de parasitismo e de patologias.

Capítulo 7.

BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

- Ackefords, H, Huner J. V., Konikoff M., 1994. *Introduction to the general principles of aquaculture*. Food Production Press, New York, USA.
- Alderman, D. J., Polglase J. L., 1988. Pathogens, Parasites and Commensals. In: D. M. Holdich, R. S. Lowery (Editores).. *Freshwater Crayfish: Biology, Management and Exploitation*. Croom & Helm, London, pp. 167-212.
- Anon, 1991. Escaped salmon go "visiting". *Fish Farm. Intern.*, 18.
- Araújo, R.M., Arribas R.M., Lucena F., Peres R., 1989. Relation between *Aeromonas* and faecal coliforms in freshwaters. *J. Appl. Bacteriol.*, 67(2): 213-217.
- Austin, B., 1985. Antibiotic pollution from fish farms: effect on aquatic microflora. *Microbiol. Sci.*, 2: 113-117.
- Austin, B., Allen-Austin, D. (1985). Microbial quality of water in intensive fish rearing. *J. Appl. Bact. Symp. Suppl.* 207S.
- Austin, B., Allen-Austin, D., (Editores), 1993. *Bacterial fish pathogens. Disease in farmed and wild fish* (2nd edition). Ellis Horwood, Ltd, Chichester.
- Bakke, T. A., Harris, P. D., 1998. Diseases and parasites in wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations. *Can. J. Fish. Aquat. Sc.*, 55 (1): 247-266.
- Barja, J. L., Toranzo, A. E., 1988. Enfermedades bacterianas de peces. In: Espinosa de los Monteros, J. & U. Labarta (Editores): *Patología en acuicultura*. Mundi-Prensa Libros, Madrid.

Beecham, T. D., Evelyn T.P.T., 1992. Genetic variation in disease resistance and growth of chinook, coho, and chum salmon with respect to vibriosis, furunculosis and bacterial kidney disease. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 121: 456-485.

Board, R. G., Jones, D., Skinner, F. A., (Editores), 1992. *Identification methods in applied and environmental microbiology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Boeger, W. A., Guimarães, A. T., 2000. Manejo sanitário em piscicultura intensiva. *Folhas técnicas em aquacultura, série enfermidades* (Univ. Fed. Paraná).

Buck, J. D., 1982. Nonstaining (KOH) method for determination of Gram reactions of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44(4): 992-993.

Burckholder, J. M., Mallin, M. A., Glasgow, H. B., Larsen, L. M., McIver, M. R., Shank, G. C., Briley, D. S., Springer, J., Touchette, B. W., Hannon, E. K., 1997.

Impacts to a coastal river and estuary from rupture of a large swine waste holding lagoon. *J. Environ. Qual.*, 26: 1451-1466.

Busch, R. A., 1978. Enteric redmouth disease (Hagerman strain). *Marine Fisheries Review*, 40: 42-51.

Busch, R. A., 1983. Enteric redmouth disease (*Yersinia ruckeri*). In: *Antigens of fish Pathogens*. Anderson, D. P., Dorson, M., Dugourget, P., (Eds.). Collection Marcel Merieux, Lyon, pp.201-223.

Bush, R. A., Lingg, A. J., 1975. Establishment of an asymptomatic carrier state infection of enteric redmouth disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 32: 2429-2432.

Cahill, M. M., 1990. Bacterial flora of fishes: a review. *Microb. Ecol.*, 19: 21-41.

Carss, D. N., 1990. Concentrations of wild and escaped fishes immediately adjacent to fish cages. *Aquaculture*, 90: 29.

Characklis, W.G., Marshall K.C., 1989. Biofilms: a basis for an interdisciplinary approach. In: Characklis, W.G., Marshall, K.C., eds. *Biofilms*. John Wiley and Sons Inc., New York.

Chevassus, B., Dorson, M., 1990. Genetics of resistance to disease in fishes. *Aquaculture*, 85: 83-107.

Cipriano, R. C., Ford, L. A., Teska, J. D., Hale, L. E., 1992. Detection of *Aeromonas salmonicida* in the mucus of salmonid fishes. *J. Aquat. An. Health*, 4: 114-118.

Clapés, B. O., 1969. Indices microbiológicos de la polución. Simposium sobre polución de las aguas, documentos de investigación hidrológica, suplemento científico de la revista *Agua* nº 7.

Collins, R. O., Foster, G., Ross, H. M., 1996. Isolations of *Yersinia ruckeri* from an Otter and salmonid fish from adjacent freshwater catchments. *Veterinary Record* 139: 169.

Colwell, R.R., Grimes, D.J., 2000. *Nonculturable microorganisms in the environment*. American Society for Microbiology Press. Washington.

Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lapin-Scott, H.M., 1995. Microbial biofilms. *Ann. Rev. Microbiol.* 49: 711-745.

Craun, G.F., 1995. Causes of waterborne diseases in the United-States. *Water Science and Technology*; 24: 17-20.

Croze, H., 1981. What ecologists think veterinarians should do. In: *Wildlife disease research and economic development*. International Development and Research Centre. Ottawa.

- Davies, R. L., Frerichs, G. N., 1989. Morphological and biochemical differences among isolates of *Yersinia ruckeri* obtained from wide geographical areas. *J. Fish Dis.*, 12: 357-365.
- Dear, G., 1988. *Yersinia ruckeri* isolated from Atlantic salmon in Scotland. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 8: 18-20.
- Effendi, I., Austin, B., 1993. A rapid method for the determination of viability of *Aeromonas salmonicida* in seawater. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 13 (5): 171-173.
- Effendi, I., Austin, B., 1994. Survival of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* in the marine environment. *J. Fish Dis.*, 17: 375-385.
- Ewing, W. H., Ross, A. J., Brenner, D. J., Fanning, G. R., 1978. *Yersinia ruckeri* sp. nov., the redmouth (RM) bacterium. *Int. J. System. Bacteriol.*, 28 (1): 37-44.
- Fidalgo, M. L., 1992. *Impacte de uma truticultura sobre a dinâmica de algumas populações bacterianas na albufeira da Caniçada (rio Cávado)*. Actas da 3ª Conferência Nacional sobre a qualidade do ambiente, volume I. Universidade de Aveiro.
- Fjalestad, K. T., Gjedrem, T., Gjerde, B., 1991. Genetic improvement of disease resistance in fish: an overview. *4th Int. Symp. on genetics in aquaculture*, Wuhn (PRC).
- Ford, L. A., 1994. Detection of *Aeromonas salmonicida* from water using a filtration method. *Aquaculture*, 122: 1-7.
- Furones, M. D., Rodgers, C. J., Munn, C. B., 1993. *Yersinia ruckeri*, the causal agent of enteric redmouth disease (ERM) in fish. In: *Annual Review of fish diseases* (Faisal, M. & F. M. Hetrick, Eds.), Pergamon press, NY, vol. 3, pp. 105-129.
- Gjedrem, T., Salte, R., Magnus-Gjoenen, H., 1991. Genetic variation in susceptibility of atlantic salmon to furunculosis. *Aquaculture*, 97: 1-6.

- Gonzalez, J. M., Whitman, W. B., Hodson, R. E., Moran, M. A., 1996. Identifying numerically abundant culturable bacteria from complex communities: an example from lignin enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 4433-4440.
- Guimarães, V. F., Araújo, M. A. V., Leda, C. S., Hagler, M., Hagler, A. N., 1993. *Pseudomonas aeruginosa* and other microbial indicators of pollution in fresh and marine waters of Rio de Janeiro, Brazil. *Env. Tox. Wat. Qual.* 8: 313-322.
- Guinea, J., Sancho, J., Pares, R., 1979. Flora microbiana del agua. *Análisis Microbiológico de Aguas. Aspectos Aplicados*. Ediciones Omega, Barcelona.
- Guthrie J. F., Kroeger, R. L., 1974. Schooling habits of injured and parasitized menhaden. *Ecology*, 55: 208-210.
- Hastein, T., Linstad, T., 1991. Diseases in wild and cultured salmon: possible interaction. *Aquaculture*, 98: 277-288.
- Havellaar, A. H., Versteegh, J. F., During, M., 1990. The presence of *Aeromonas* in drinking water supplies in the Netherlands. *Int. J. Hyg. Env. Med.*, 190(3): 236-256.
- Hays, T., 1980. Impact of net-pen culture on water quality and fish populations on Bull Shoals reservoir. *Compl. Rep. Ark. Game fish. Comm. AGFC Proj. 2-338-R-1:10*.
- Hiney, M., Dawson, M. T., Heery, D. M., Smith, P. R., Gannon, F., Powell, R., 1992. DNA probe for *Aeromonas salmonicida*. *Appl. Env. Microbiol.*, 58 (3): 1039-1042.
- Hiorns, W. D., Methe, B. A., Nierzwicki-Bauer, S. A., Zehr, J. P., 1997. Bacterial diversity in Adirondack Mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 2975-2960.
- Hunter, V. A., Knittel, M. D., Fryer, J. L., 1980. Stress-induced transmission of *Yersinia ruckeri* infection from carriers to recipient steelhead trout *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Dis.*, 3: 467-472.

- Hurst, J. C., Knudsen, G. R., McInerney, M. J., Stetzenbach, L. D., Walter, M, V., (editores) 1997. *Manual of Environmental Microbiology*. Am. Soc. Microbiol. Washington D. C.
- Iwama, G. K., 1991. Interactions between aquaculture and the environment. Critical reviews *In: Environ. Control.*, 21(2): 177-216.
- Jarp, J., Tangen, K., Willumsen, F. V., 1993. Risk factors for infection with *Aeromonas salmonicida* subs. *salmonicida*. *In: Norwegian Freshwater hatcheries*. Dis. Aquat. Org. 17: 81-86.
- Keevil, C.W., Dowsett, A. B., Rogers, J., 1993. *Legionella* biofilms and their control. *In: Denyer S.P. ed. Society for Applied Bacteriology Technical series*. 30: 201-215. Oxford.
- Kent, M. L., Fournie J. W., 1993. Importance of marine fish diseases-an overview pp. 1-24. *In: Pathobiology of marine estuarine organisms*. Couch J. A., Fournie J. W. (Editores). CRC Press. Boca Raton.
- Kilambi, R. V., Adams, J. C., Wickizer, W. A., 1978. Effects of cage-culture on growth, abundance and survival of resident largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *J. Fish. Res. Board Can.*, 35: 157.
- Krebs C. J., 1994. *Ecology: the experimental analysis of distribution and abundance*. Fourth edition. Harper Collins College Publishers. New York.
- Krieg, N. R., Holt, J. G., (Editores), 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 9th Edition. Vol.1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Lemke, M. J., Brown, B. J., Leff, L. G., 1997. The response of three bacterial populations to pollution in a stream. *Microb. Ecol.*, 34: 224-231.

Levings, C. D., 1994. Some ecological concerns for net-pen culture of salmon on the coasts of the Northwest Pacific and Atlantic Oceans, with special reference to British Columbia. *J. Appl. Aquaculture*, 4: 65-141.

Loyacano, H. A., Smith G. K., 1975. Attraction of native fish to catfish culture cages in reservoirs. *Proc. Annu. Conf. Southeast Assoc. Game fish. Comm.*, 29: 63.

MacMillan, J. R., Santucci, T., 1990. Seasonal trends in intestinal bacterial flora of farm-raised channel catfish. *J. Aquat. Animal Health*, 2: 217-222.

Maheshkumar, S., Goyal, S. M., Economon, P. P., 1990. Concentration and detection of *Aeromonas salmonicida* from hatchery water. *J. Fish Dis.*, 13: 513-518.

Mallin, M.A., Burkholder, J. M., McIver, Shank, G. C., Glasgow, H. B., Touchette, B. W., Springer, J., 1997. Comparative effects of poultry and swine waste lagoon spills on the quality of receiving streamwaters. *J. Environ. Qual.*, 26: 1622-1631.

Malone R. F., Burden D. G., 1988. *Design of recirculating soft crawfish shedding systems*. Louisiana Sea Grant College Program, Center for Wetland Resources, Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana, USA.

McArdle, J. F., Dooley-Martyn, 1985. Isolation of *Yersinia ruckeri* type I (Hagerman strain) from goldfish *Carassius auratus* (L.). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 5 (1) 10-11.

Mccarthy, D. H., Roberts R. J., 1980. Furunculosis of fish-The present state of our Knowledge. In: Droop M. R., Jannasch, H. W. (editores). *Advances in aquatic microbiology Vol. 2.* Academic Press. London.

McVicar, A. H., 1997. Interaction of pathogens in aquaculture with wild fish populations. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 17(6): 197-200.

Meyer, F. P., Warren, J. W., Carey, T. G., 1983. *A guide to integrated fish health management in the Great Lakes basin*. Great Lakes fisheries commission, Ann Arbor, Michigan. Spec. Pub., 83-2.

Miettinen I., Kainulainen T., Vartiainen T., Martikainen, P., 1993. Bacterial growth potencial and mutagenicity in processed drinking water. *Kuopion yliopiston julkaisu*, C14: 199-200.

Moller H., Anders K., 1986. *Diseases and Parasites of marine fishes*. Verlag Moller. Kiel.

Momot W., Gowing H., Jones P. D., 1978. The dynamics of crayfish and their role in the ecosystem. *Am. Midl. Nat.*, 99: 10-35.

Moore, J. A., 1991. Surface transport of microorganisms by water. *Biotechnology*, 15: 41-55.

Morris R., 1997. Waterborne diseases-how real a threat? *In: Morris, R., Gammie, A., 2nd eds. UK Symposium on Health-related Water Microbiology. University of Warwick. 1997: 43-55.*

Munro A. L. S., Leversidge J., Elson, K. G. R., 1976. The distribution and prevalence of infectious pancreatic necrosis virus in wild fish in Loch Awe. *Proc. R. Soc. Edinb.* B75: 223-232.

Nieto, T. P., Toranzo, A. E., Barja, J. L., 1984. Comparison between the bacterial flora associated with fingerling rainbow trout cultured in two different hatcheries in the North-West of Spain. *Aquaculture*, 42: 193-206.

O'Brien, D., Mooney, J., Ryan, D., 1994. Detection of *Aeromonas salmonicida*, causal agent of furunculosis in salmonid fish, from the tank effluent of hatchery reared atlantic salmon smolts. *Appl. Envir. Microbiol.*, 60: 3847-3877.

- O'Leary W., 1989. *Practical Handbook of Microbiology*. Boca Raton, Crc Press.
- Parsons, T. R., Rokeby, B. E., Lalli, C. M., Levings, C. D., 1990. Experiments on the effect of salmon farm wastes on planckton ecology. *Bulletin of the planckton society of Japan*, 37: 49-57.
- Pathak S. P., Bhattacharjee J. W., Kalra N., Chandra S., 1988. Seasonal distribution of *Aeromonas hydrophila* in river water and isolation from fish. *J. Applied Bacteriol.*, 65(4): 347-352.
- Pedro-Alió, C., Newell, S. Y., 1989. Microautoradiographic study of the thymidine uptake in brackish waters around Sapelo Island, Georgia, USA. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 55: 83-94.
- Penczak, T., Galicka, W., Molinski, M., Kusto, E., Zalewski, M., 1982. The enrichment of a mesotrophic lake by carbon, phosphorus and nitrogen from the cage aquaculture of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Appl. Ecol.*, 19: 371.
- Phillips, M. J., 1987. *Environmental aspects of freshwater cage culture*. Scottish Fish Farming Conference.
- Phillips, M. J., Beveridge, M. C. M., Ross, L. G., 1985. The environmental impact of salmonid cage culture on inland fisheries: present status and future trends. *J. Fish Biol.*, 27 (suplement A): 123-137.
- Rhodes W. M., Kator, H., 1994. Seasonal occurrence of mesophilic *Aeromonas* spp. as function of biotype and Water quality in temperate freshwater lakes. *Water Res.*, 28(11): 2241-2251.
- Rintamaki, P., Valtonen, E. T., Frerichs, G. N., 1986. Occurrence of *Yersinia ruckeri* infection in farmed white fish, *Coregonus peled* Gmelin and *Coregonus muksun* Pallas, and Atlantic salmon, *salmo salar* L., in northern Finland. *J. Fish Dis.*, 9: 137-140.
- Roberts, M. S., 1985. Why ERM gives cause for concern. *Fish Farmer*, 8: 27.

- Rodgers, C. J., 1991. The usage of vaccination and antimicrobial agents for control of *Yersinia ruckeri*. *J. Fish Dis.*, 14: 291-301.
- Romalde, J. L., 1992. *Yersinia ruckeri*: estudio epidemiológico y del mecanismo de virulencia. Tese de doutoramento. Santiago de Compostela.
- Romalde, J. L., Magariños, B., Pazos, F., Silva, A., Toranzo, A. E., 1994. Incidence of *Yersinia ruckeri* in two farms in Galicia (NW Spain) during a one-year period. *J. Fish Dis.*, 17: 533-539.
- Romalde, J. L., Toranzo, A. E., 1991. Evaluation of the API-20E system for the routine diagnosis of the enteric redmouth disease. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 11 (4): 147-149.
- Rosenthal, H., Scarratt, D. J., McInerney-Northcott, M., 1995. Aquaculture and the environment. In: Boghen, A. D. (Ed.). *Cold-water aquaculture in Atlantic Canada*. 2nd Ed. Inst. Can. Res. Dev. Reg. pp. 451-500.
- Ross, A. J., Rucker, R. R., Ewing, W. H., 1966. Description of a bacterium associated with redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Microbiol.*, 12: 763-770.
- Samuelson, O. B., Torsvik, V., Hansen, P. K., 1988. Organic Waste and antibiotics from aquaculture. *ICES 1988/F:14*. Institute of Marine Research, Norway.
- Santos, Y., Romalde, J. L., Bandín, I., Magariños, B., Núñez, S., Barja, J. L., Toranzo, A. E., 1993. Usefulness of the API-20E system for the identification of bacterial fish pathogens. *Aquaculture*, 116: 111-120.
- Saunders, R. L., 1991. Potencial interaction between cultured and wild atlantic salmon. *Aquaculture*, 98: 51-60.

Schwinghamer, P., 1988. Influence of pollution along a natural gradient and in a mesocosm experiment on sediment microbial numbers and biomass. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 46: 193-197.

Scott M. E., Smith G., 1994. *Parasitic and Infectious Diseases*. Academic Press. San Diego.

Smibert, R. M., Krieg, N. R., 1994. Phenotypic characterization. In: Gerhardt, P., Murray, R. G., Wood, W. A., Krieg, N. R., (Editores). *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, D. C., pp. 607-654.

Snieszko, S. F., 1974. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *J. Fish Biol.*, 6: 197-208.

Sousa, J. A., 1996. *Estudo epidemiológico em duas triticulturas do Norte de Portugal e caracterização dos agentes bacterianos e virais de maior impacto em aquacultura*. Dissertação de Doutoramento. Porto.

Stephen C., Iwama G., 1997. *Salmon Aquaculture Review*. Environmental Assessment Office of British Columbia, Canada.

Stephen R. C., Ribble, C. S., 1994. An evaluation of surface moribund salmon as indicators of seapen disease status. *Aquaculture*, 133: 1-8.

Stevenson, R. M. W., Daly, J. G., 1982. Biochemical and serological characteristics of Ontario isolates of *Yersinia ruckeri*. *Can. J. Fish. Aquatic. Sc.*, 39: 870-876.

Stoskopf, M. K., 1993. *Fish Medicine*. W. B. Saunders Company. Philadelphia.

Szewzyk U., Manz W, Ammam R., Schleifer, K. H., Stenstrom, T.A., 2000. Growth and *in situ* detection of a pathogenic *Escherichia coli* in biofilms of a heterotrophic water

bacterium by use of 16S and 23S-rRNA-directed fluorescence oligonucleotide probes. *FEMS Microbiology and Ecology*; 13: 169-176.

Thoesen, J. C. (Editor), 1994. *Suggested procedures for the detection and identification of certain finfish and shellfish pathogens*. 4th edition, Fish Health Section, American Fisheries Society, Bethesda.

Thrusfield, M., 1995. *Veterinary Epidemiology*. Second Edition. Blackwell Scientific Ltd. Oxford.

Toranzo, A. E., Combarro, P., Conde, Y., Barja, J.L., 1985. Bacteria isolated from rainbow trout reared in freshwater in Galicia (Northwestern Spain): Taxonomic analysis and drug resistance patterns. In: A. E. Ellis (Editor). *Fish and Shellfish pathology*. Academic Press. London.

Vijayan M. M., Moon T. W., 1994. The stress response and the plasma disappearance of corticosteroid and glucose in a marine teleost, the sea raven. *Can. J. Zool.*, 72: 379-386.

Waltman, W. D., Shotts, E. B., 1984. A medium for the isolation and differentiation of *Yersinia ruckeri*. *Can. J. Fish. Aquat. Sc.*, 41: 804-806.

WHO, 1993. Guidelines for drinking water quality 1: Recommendations. World Health Organisation, Geneva.

Wills, C., 1996. *Plagues: their origin, history and fortune*. Harper Collins Publishers, London.

Willumsen, B., 1989. Birds and wild fish as potential vectors of *Yersinia ruckeri*. *J. Fish. Dis.*, 12: 275-277.

Winsby, M., Sander, B., Archibald, D., 1996. *The environmental effects of salmon net-cage culture in British Columbia*. Ministry of Environment, province of British Columbia.

Wolf, N. G., 1985. Odd fish abandon mixed-species groups when threatened. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 17: 47-52.

Wood, J. H., 1979. *Diseases of pacific salmon. Their prevention and treatment*. Third edition. State of Washington, department of fisheries hatchery division.

Capítulo 8.
ANEXOS

8. ANEXOS

Nas figuras seguintes mostra-se na forma de gráfico os resultados obtidos.

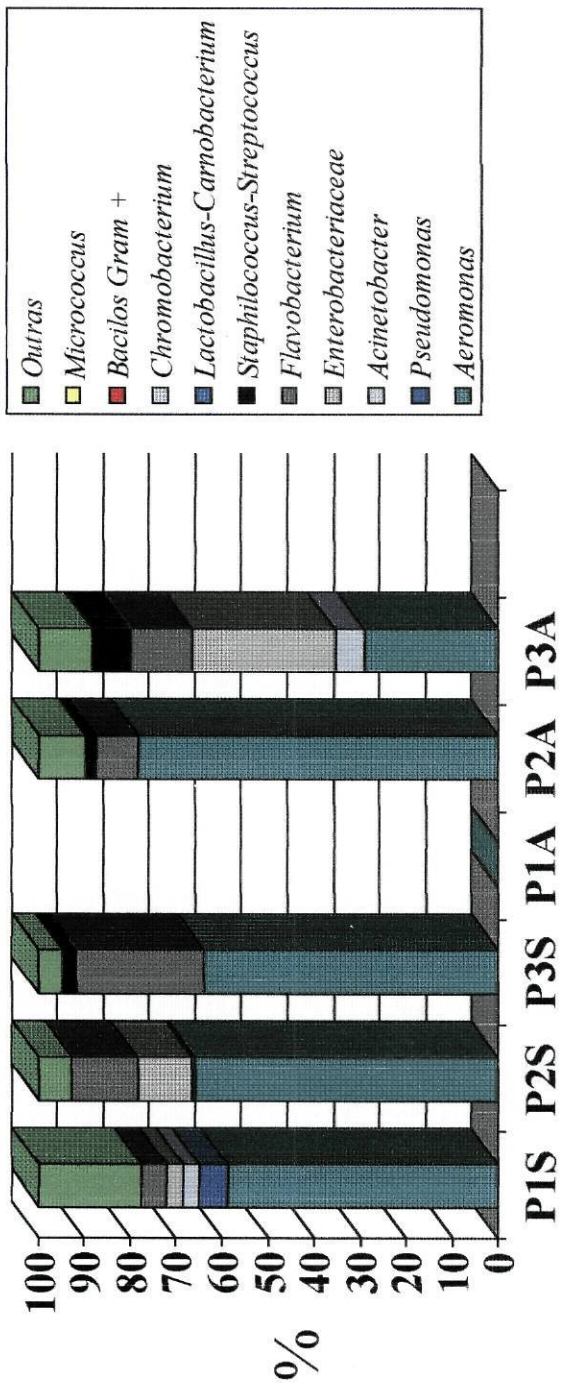


Fig 1-Mês Setembro 1999

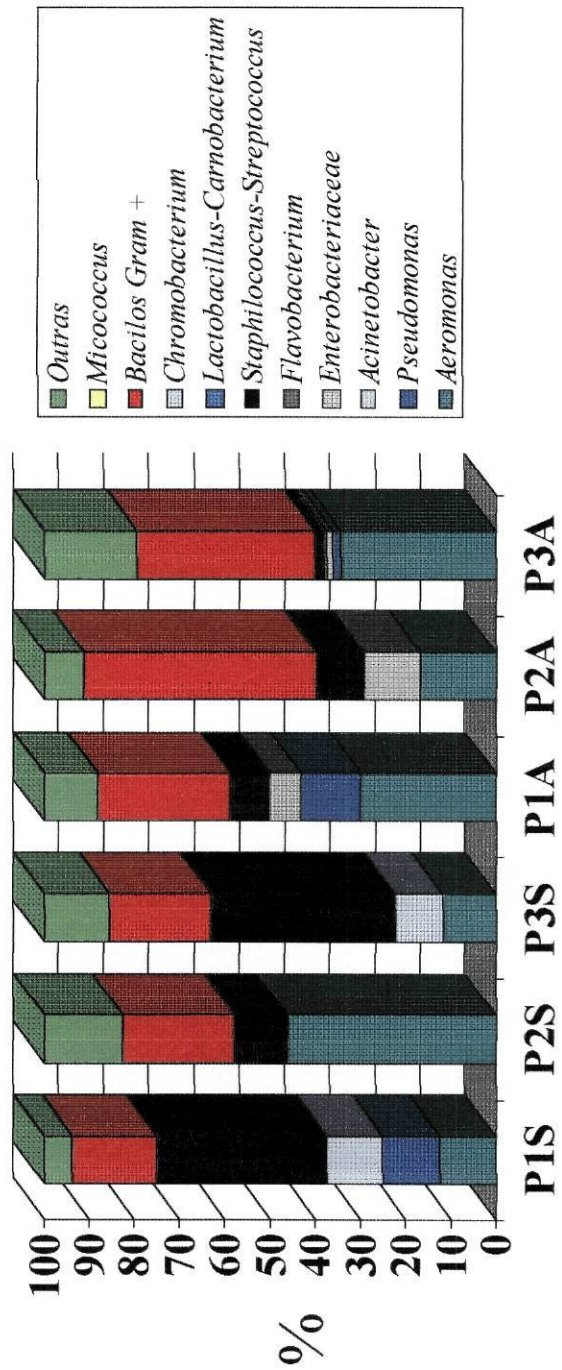


Fig. 2-Mês Outubro

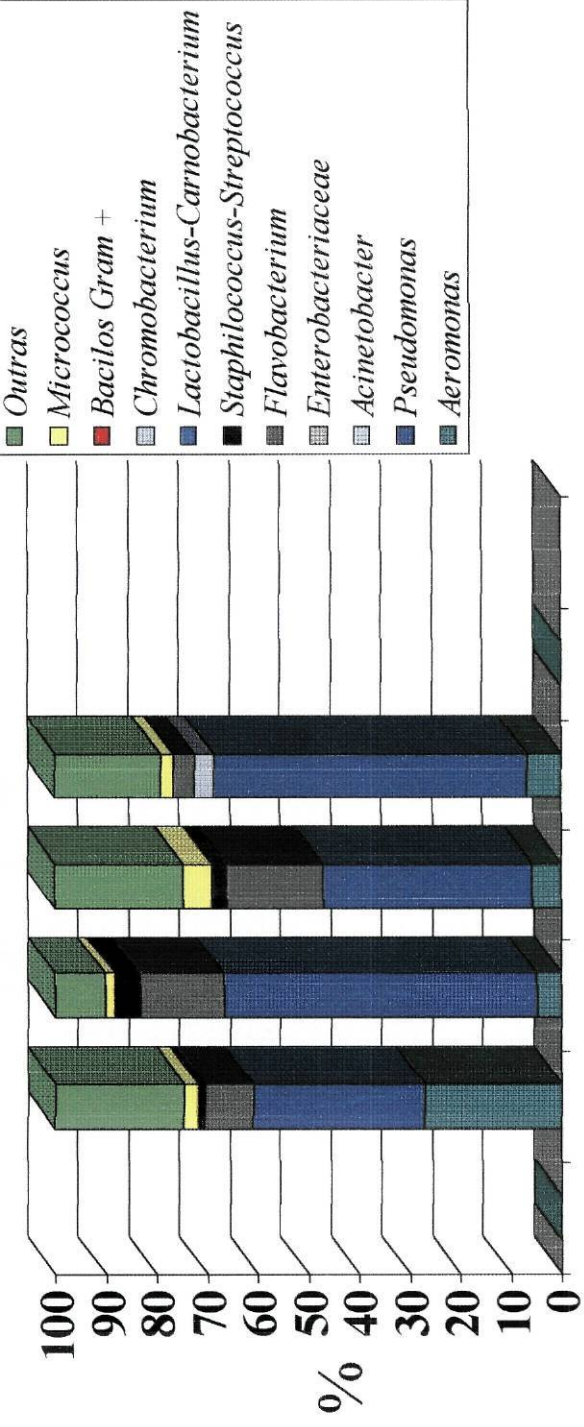


Fig.3-Mês de Novembro

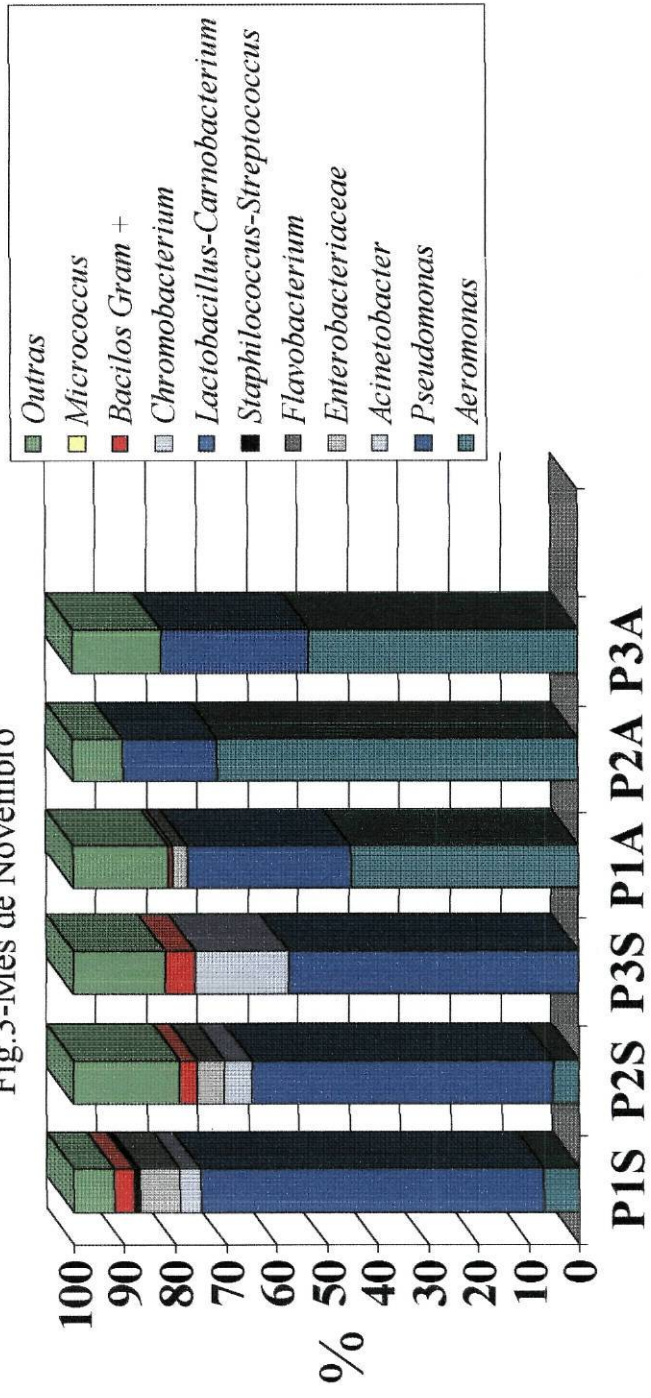


Fig.4-Mês de Dezembro

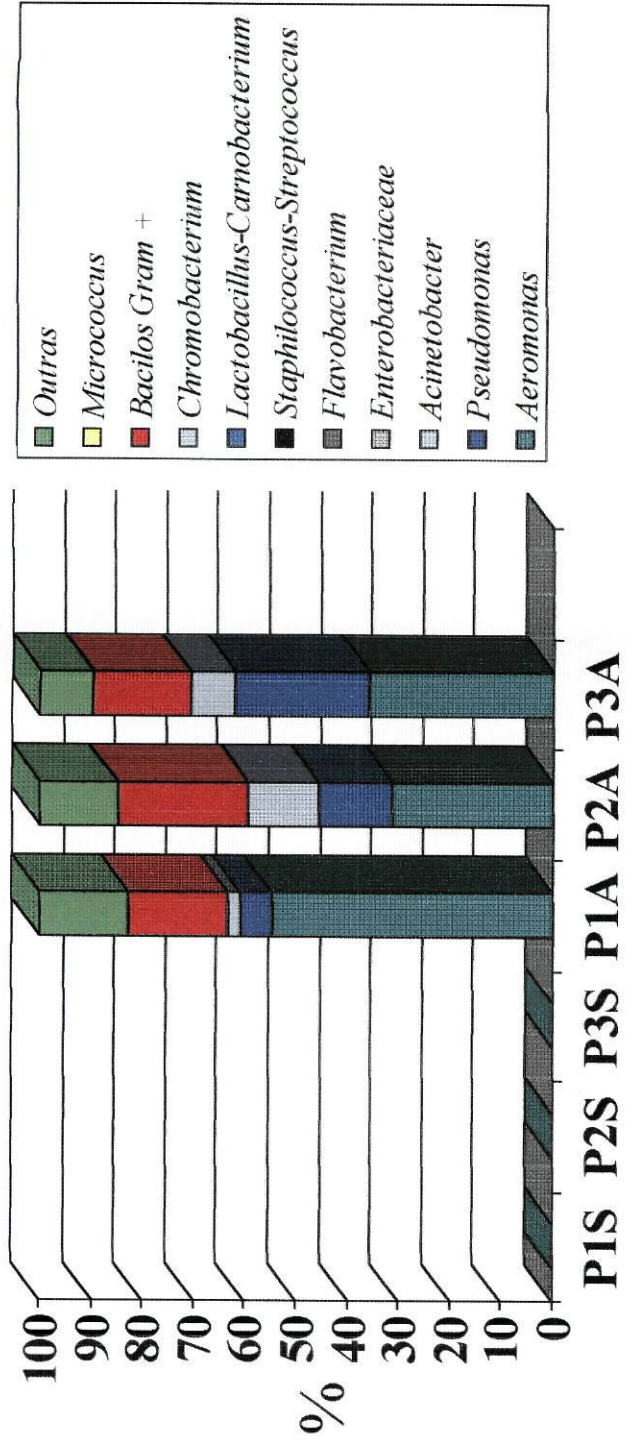


Fig. 5-Mês de Janeiro

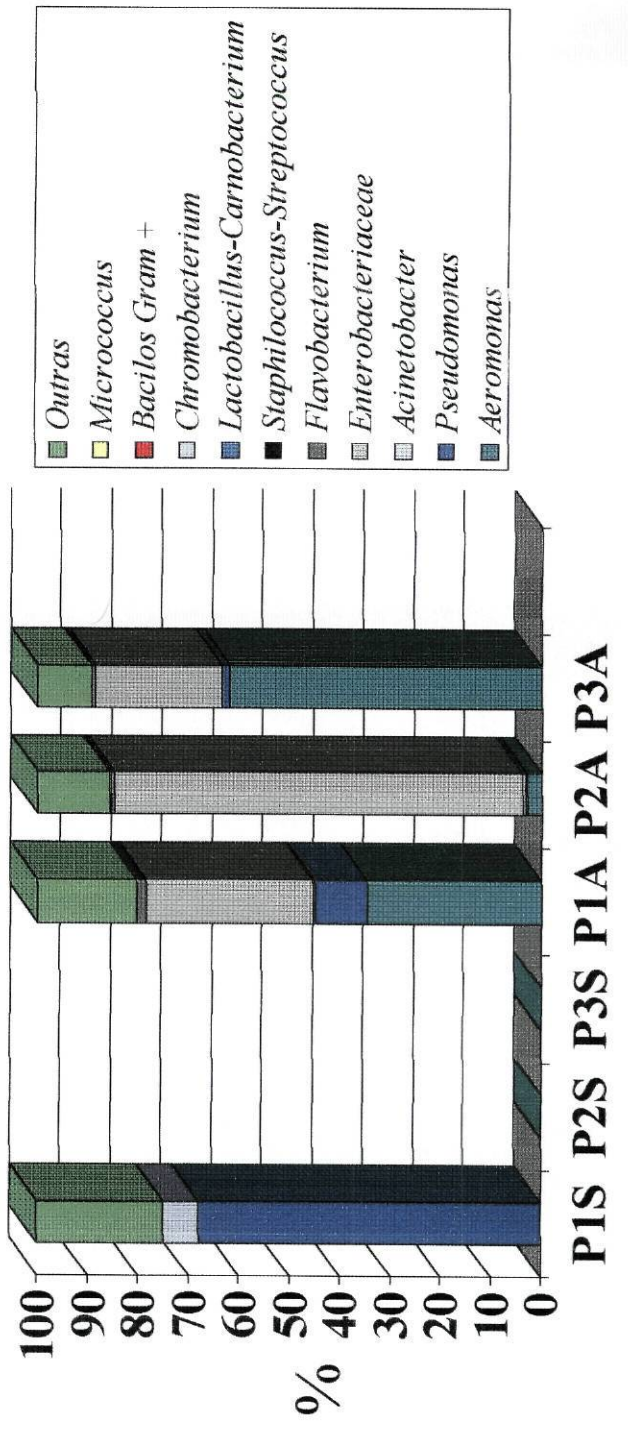


Fig. 6-Mês de Fevereiro

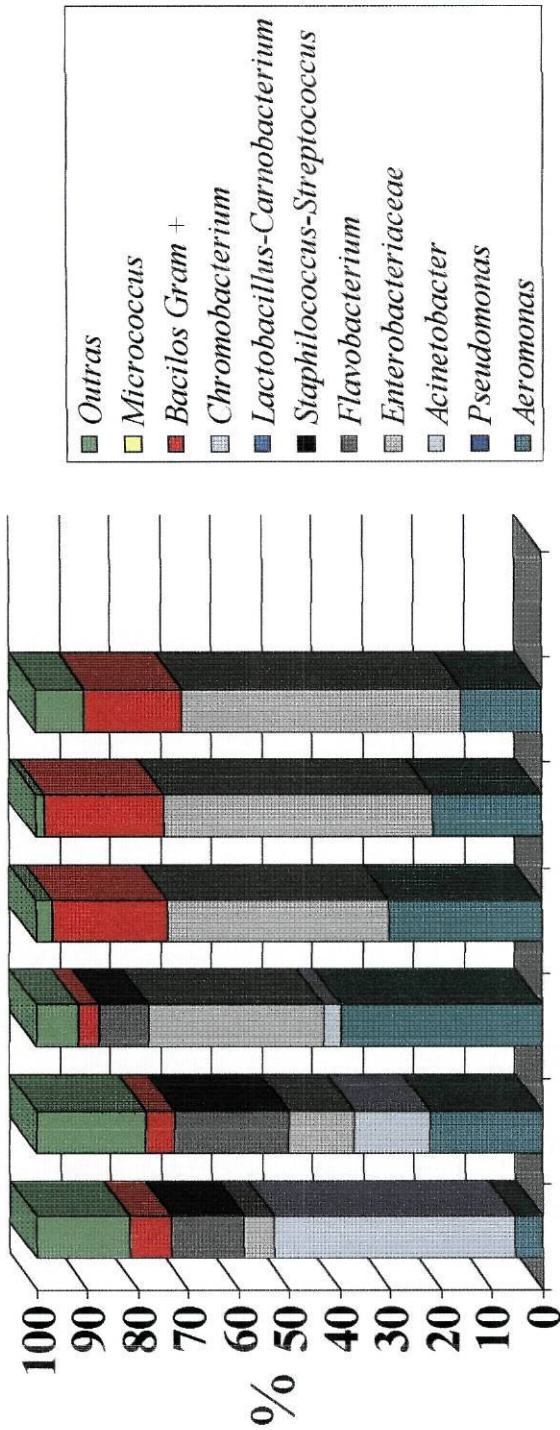


Fig.7-Mês de Março

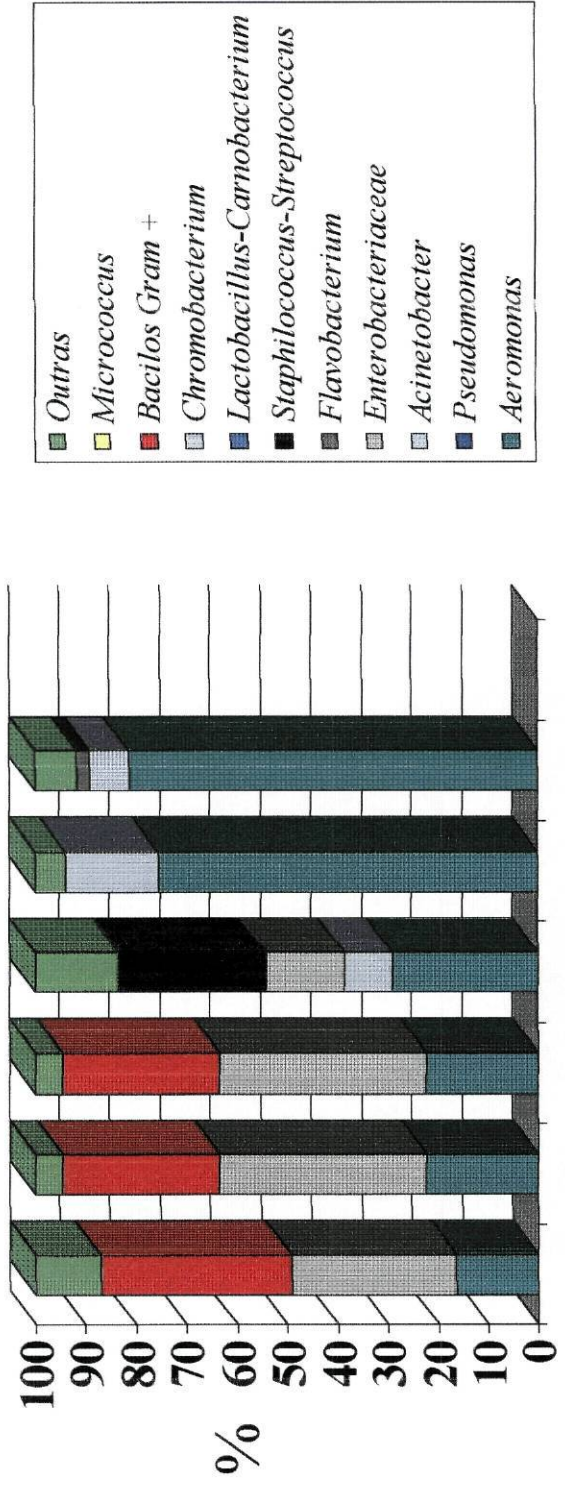
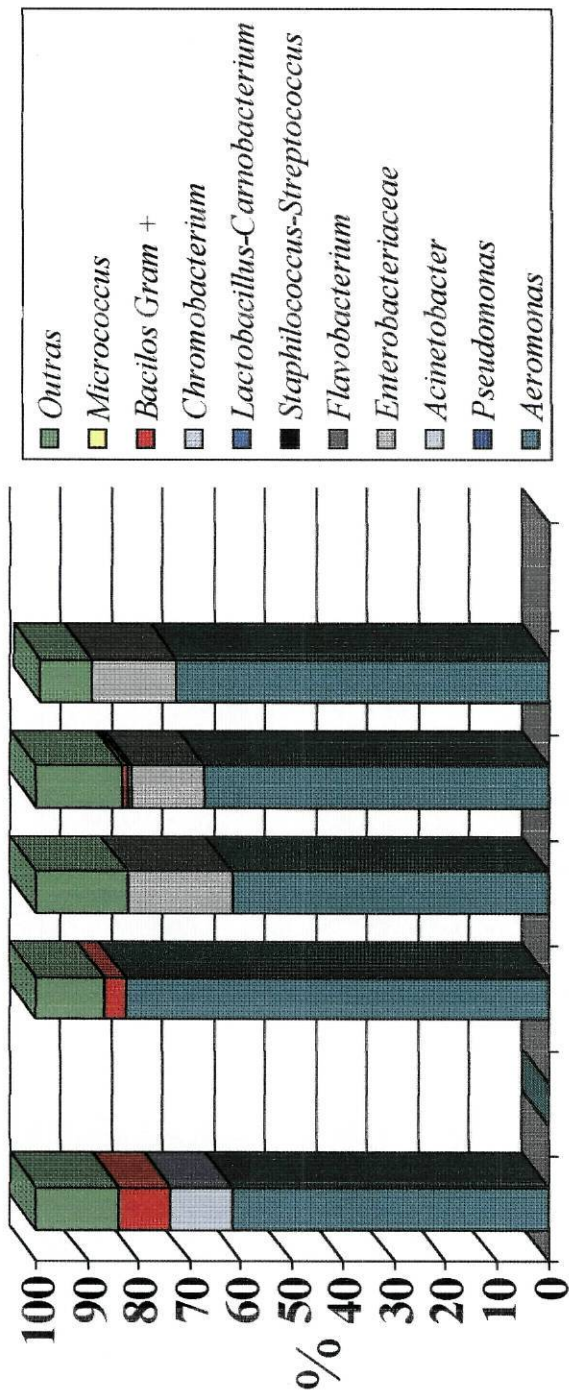
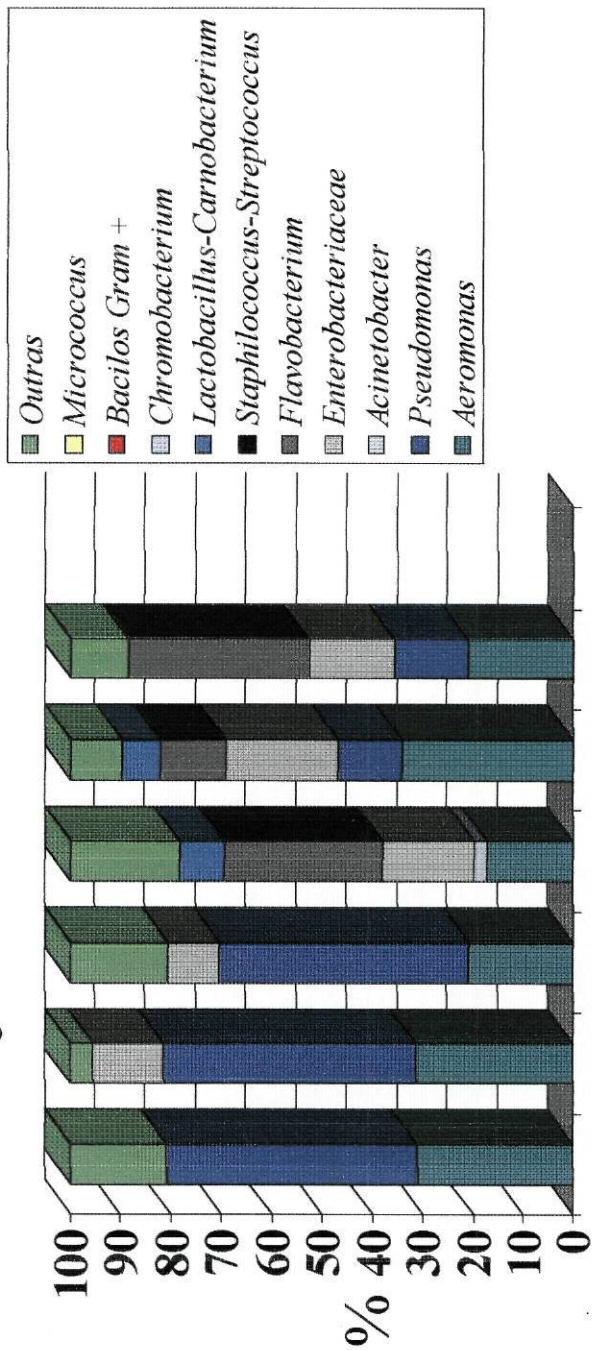


Fig.8-Mês de Maio



P1S P2S P3S P1A P2A P3A

Fig.9-Mês de Junho



P1S P2S P3S P1A P2A P3A

Fig.10-Mês de Julho

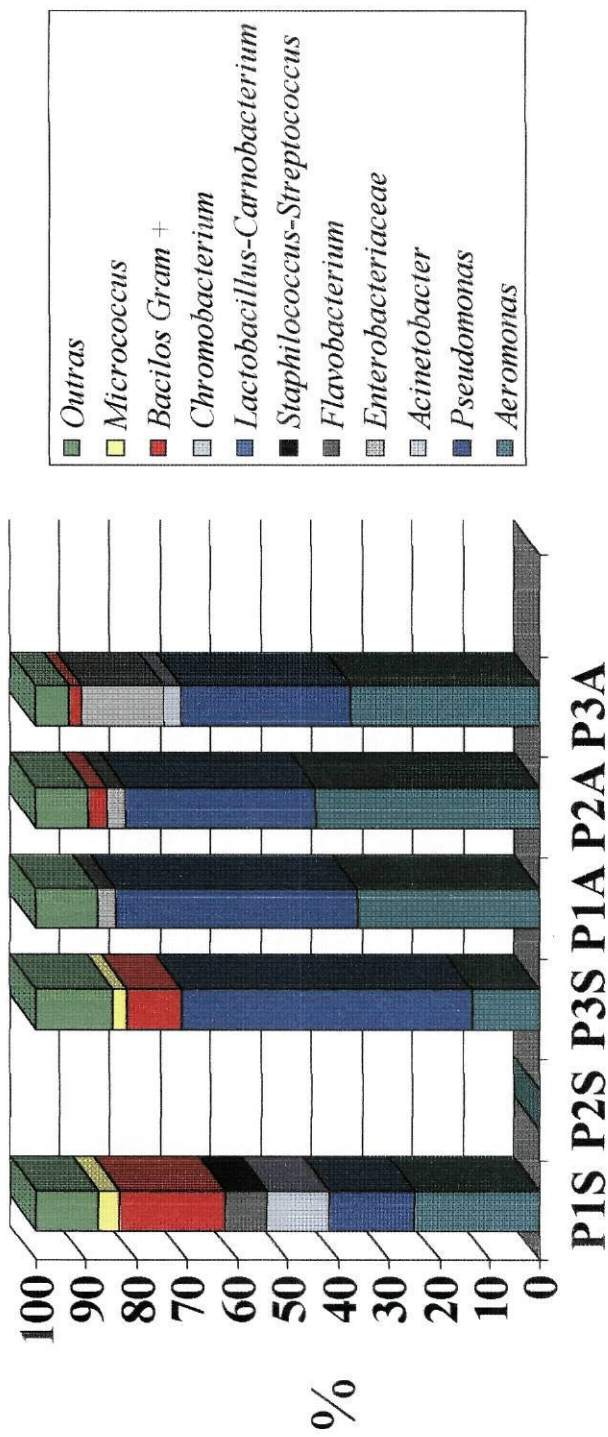


Fig.11-Mês de Agosto

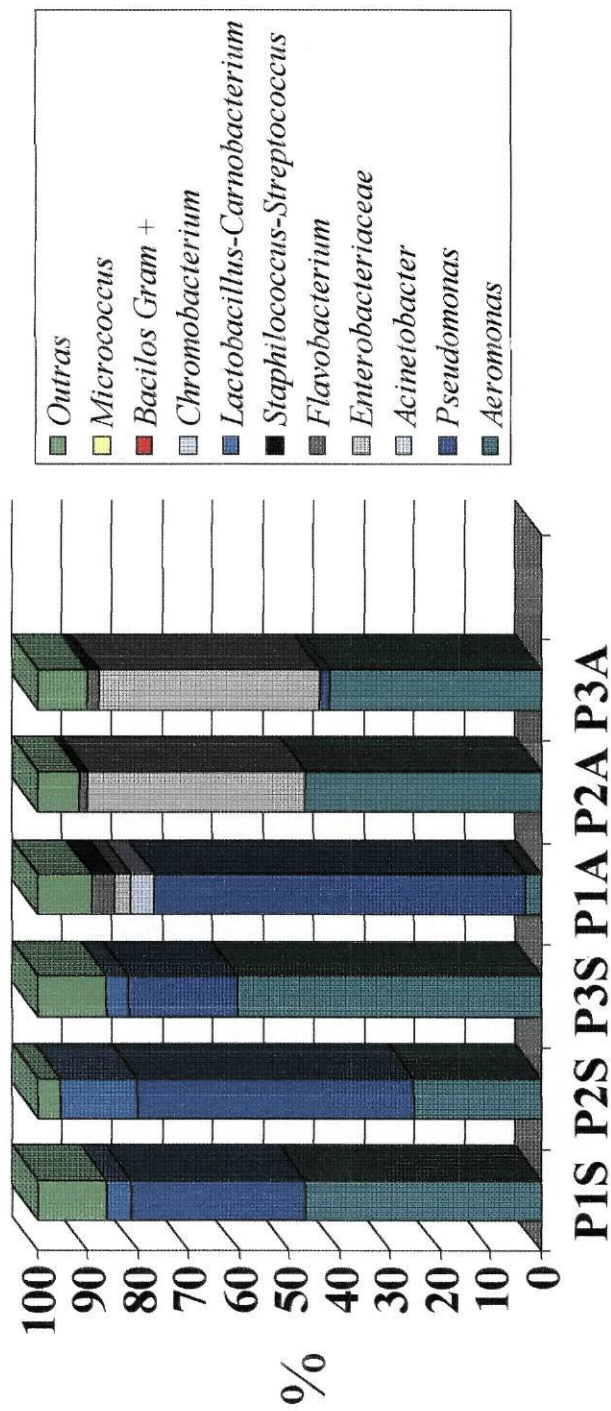


Fig.12-Mês de Setembro 2000