

Procedimentos Analíticos Para Avaliação de Doenças de Peixes



ISSN 1678-1953

Dezembro, 2015

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Tabuleiros Costeiros
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 204

Procedimentos Analíticos para Avaliação de Doenças de Peixes

Rodrigo Yudi Fujimoto
Edsandra Campos Chagas
Marcia Mayumi Ishikawa
Magda Vieira Benavides
Alitiane Moura Lemos Pereira
Marina Keiko Pieroni Iwashita
Patricia Oliveira Maciel
Cheila Boijink
Claudia Majolo
Marcos Tavares-Dias
Sandro Loris Aquino Pereira
Daniel Massato Vital Hide

Embrapa Tabuleiros Costeiros
Aracaju, SE
2015

Embrapa Tabuleiros Costeiros
Av. Beira Mar, 3250, CEP 49025-040, Aracaju, SE
Fone: (79) 4009-1300
Fax: (79) 4009-1369
www.embrapa.com.br
www.embrapa.br/fale-conosco

Comitê Local de Publicações

Comitê Local de Publicações da Embrapa Tabuleiros Costeiros

Presidente: *Marcelo Ferreira Fernandes*

Secretária-executiva: *Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues*

Membros: *Ana Veruska Cruz da Silva Muniz, Carlos Alberto da Silva, Élio César Guzzo, Hymerson Costa Azevedo, João Gomes da Costa, Josué Francisco da Silva Junior, Julio Roberto de Araujo Amorim, Viviane Talamini e Walane Maria Pereira de Mello Ivo*

Supervisão editorial: *Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues*

Normalização bibliográfica: *Josete Cunha Melo*

Editoração eletrônica: *Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues*

Foto da capa: *Marcia Mayumi Ishikawa*

1ª Edição

On-line (2015)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Tabuleiros Costeiros

Procedimentos analíticos para avaliação de doenças de peixes / Rodrigo Yudi Fujimoto ... [et al.] – Aracaju : Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2015.

26 p. (Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN 1678-1953; 204).

Disponível em: <<https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br>>

1. Peixe. 2. Piscicultura. 3. Tambaqui. 4. Doença. 5. Colossoma macropomum. 6. Baixo São Francisco. I. Fujimoto, Rodrigo Yudi. II. Chagas, Edssandra Campos. III. Ishikawa, Marcia Mayumi. IV. Benavides, Magna Vieira. V. Pereira, Alitiene Moura Lemos. VI. Iwashita, Marina Keiko Pieroni. VII. Maciel, Patricia Oliveira. VIII. Boijink, Cheila. IX. Majolo, Claudia. X. Tavares-Dias, Marcos. XI. Pereira, Sandro Aquino Loris. XII. Hide, Daniel Massato Vital. XIII. Série.

CDD 639.3 Ed. 21

Autores

Rodrigo Yudi Fujimoto

Zootecnista, doutor em Aquicultura, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

Edsandra Campos Chagas

Engenheira de Pesca, doutora em Aquicultura, pesquisadora da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM

Marcia Mayumi Ishikawa

Médica Veterinária, doutora em Parasitologia Veterinária, pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP

Magda Vieira Benavides

Zootecnista, doutora em Wool Science, pesquisadora da Embrapa Peca e Aquicultura, Palmas, TO

Alitieni Moura Lemos Pereira

Tecnóloga em Aquicultura, doutora em Aquicultura, pesquisadora da Embrapa Meio Norte, Parnaíba, PI

Marina Keiko Pieroni Iwashita

Médica Veterinária, doutora em Aquicultura, pesquisadora da Embrapa Pesca e Aquicultura, Palmas, TO

Patricia Oliveira Maciel

Médica Veterinária, mestre em Biologia de Água Doce e Pesca Interior, pesquisadora da Embrapa Pesca e Aquicultura, Palmas, TO

Cheila Boijink

Bióloga, doutora em Ciências Fisiológicas,
pesquisadora da Embrapa Amazônia Ocidental,
Manaus, AM

Claudia Majolo

Química Industrial, doutora em ciências
veterinárias, analista da Embrapa Amazônia
Ocidental, Manaus, AM

Marcos Tavares-Dias

Biólogo, doutor em Aquicultura, pesquisador da
Embrapa Amapá, AP

Sandro Loris Aquino Pereira

Engenheiro de Pesca, doutor em Biologia de Água
Doce e Pesca Interior, pesquisador da Embrapa
Roraima, RR

Daniel Massato Vital Hide

Engenheiro de Pesca, mestre em Saúde e
Ambiente, Aracaju, SE

Apresentação

Na atividade de aquicultura, a piscicultura é um ramo promissor, que contribui significativamente para o fornecimento de peixes para o mercado interno e externo. Auxilia também na melhora nutricional, na segurança alimentar e na subsistência de muitas famílias em regiões remotas e/ou zonas rurais pobres de todo o mundo. O aumento do número de pisciculturas em todo o Brasil associado à intensificação da produção tem feito com que os produtores se preocupem com a sobrevivência, a sanidade e a qualidade dos peixes.

Mortalidades de peixes decorrem na maioria dos casos pelo estresse provocado nos sistemas de criação, que muitas vezes, não são acompanhados por técnicos capacitados na identificação das doenças e na tomada de medidas profiláticas ou terapêuticas.

O grupo de sanidade aquícola da Embrapa percebeu a necessidade de mais estudos com relação à sanidade de peixes, assim como a falta de laboratórios para atender a demanda de produtores em regiões como Nordeste, Norte e Centro-Oeste, e a quantidade incipiente de dados epidemiológicos das doenças de peixes para o Brasil. Assim, nesse sentido, disponibilizamos este documento como um guia prático de procedimentos de coleta e processamento de material biológico para avaliações dos aspectos sanitários na criação de peixes.

Manoel Moacir Costa Macêdo

Chefe-geral da Embrapa Tabuleiros Costeiros

Sumário

Procedimentos Analíticos para Avaliação de Doenças de Peixes	7
Obtenção de informações técnicas da propriedade	7
Caracterização da qualidade ambiental e da água	7
Procedimentos analíticos com os peixes	9
Amostragens de peixes e coleta de amostras biológicas a campo ...	9
Envio dos peixes para o laboratório	11
Análises laboratoriais	13
Estação 1. Anestesia e Biometria	13
Estação 2. Parasitologia: análise das brânquias	14
Estação 3. Bacteriologia e Virologia	16
Cultivo de <i>Aeromonas hydrophila</i>	18
Cultivo de <i>Flavobacterium columnare</i>	19
Cultivo de <i>Streptococcus agalactiae</i>	19
Identificação molecular das bactérias	19
Análises virológicas	20
Detecção viral por Teste de Imunofluorescência (IFT) ou por ELISA para SVCV	20
Diagnóstico dos vírus (IHN, VHS)	20
Estação 4. Análises parasitológicas	21
Referências	24
Anexos	

Procedimentos Analíticos para Avaliação de Doenças de Peixes

Rodrigo Yudi Fujimoto
Edsandra Campos Chagas
Marcia Mayumi Ishikawa
Magda Vieira Benavides
Alitieni Moura Lemos Pereira
Marina Keiko Pieroni Iwashita
Patricia Oliveira Maciel
Cheila Boijink
Claudia Majolo
Marcos Tavares-Dias
Sandro Loris Aquino Pereira
Daniel Massato Vital Hide

Obtenção de informações técnicas da propriedade

A aplicação de questionários e/ou perguntas guiadas é um meio de obter informações e criar um banco de dados das pisciculturas amostradas (Anexo 1). Pela aplicação de questionários avaliam-se as condições de infraestrutura, a situação socioeconômica das propriedades, manejo dos peixes, ocorrência de doenças e formas de comercialização do pescado, informações estas auxiliares para o levantamento de dados epidemiológicos e socioeconômicos sobre a criação dos peixes em estudo.

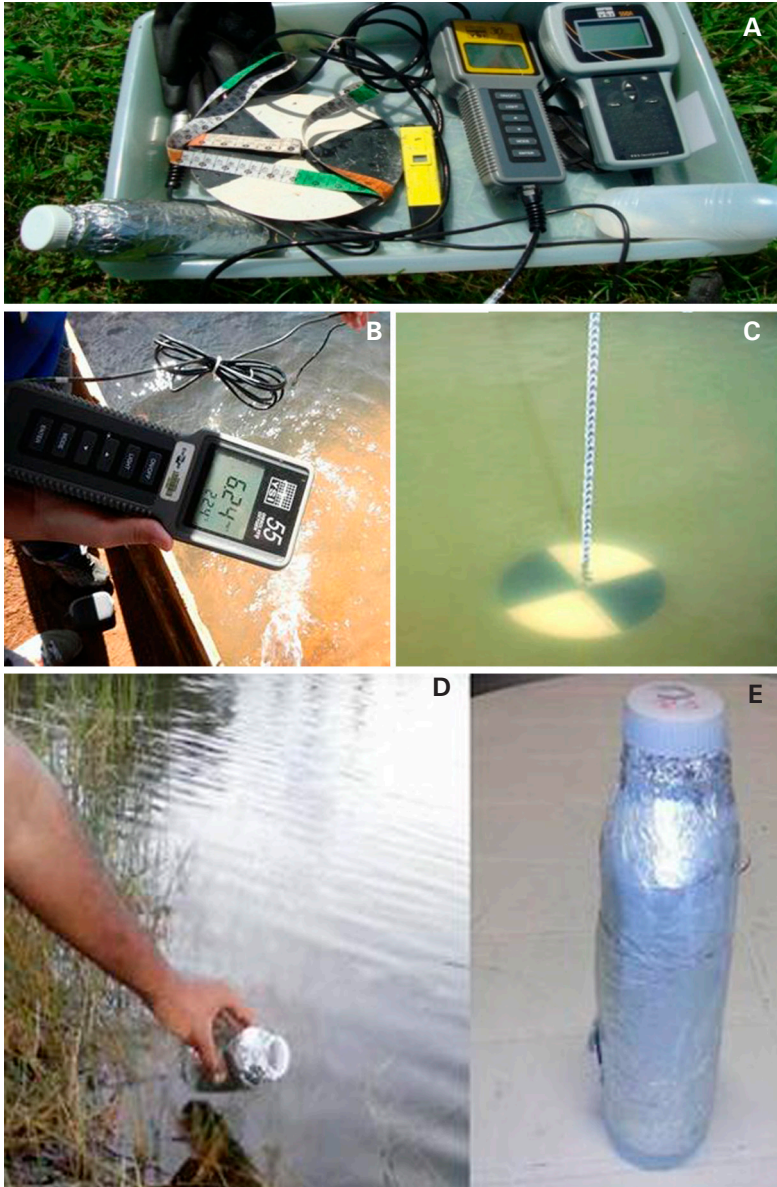
Dessa forma, o questionário deve ser aplicado por uma pessoa treinada para que as informações obtidas sejam fidedignas da realidade estudada.

Caracterização da qualidade ambiental e da água

Recomenda-se que as coletas sejam realizadas no mesmo horário, preferencialmente antes das 9 horas da manhã. Aconselha-se envolver os proprietários piscicultores ou encarregados na coleta de amostras biológicas e variáveis de qualidade de água dos viveiros.

As coletas de amostras biológicas e de água in situ devem ser realizadas antes dos peixes serem manejados.

As variáveis de qualidade da água dos viveiros tais como temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade elétrica devem ser determinadas in situ com auxílio de sondas multiparâmetros ou monoparamétricas. A transparência e a profundidade dos tanques devem ser determinadas com o auxílio do disco de Secchi. Essas variáveis devem ser medidas na entrada e na saída de água, nos mesmos viveiros de onde serão amostrados os peixes para análise (Figura 1).



Fotos: Daniel Masato Vital Hide

Figura 1. A) Equipamentos e materiais necessários para coleta de água; B) Determinação in situ de variáveis da água com sonda multiparâmetro; C) Determinação da transparência do disco de Secchi; D e E) Coleta de água com garrafa de polietileno.

A alcalinidade, dureza total, amônia total, nitrito, fósforo e clorofila-A são determinadas por métodos analíticos no laboratório (Anexos). Para tanto, amostras de água devem ser coletadas dos viveiros, a 50 cm da superfície da água, utilizando garrafas coletoras de polietileno de 500 mL, e devem ser protegidas da luz, como por exemplo, revestir a garrafa com papel alumínio (Figura 1) ou utilizar vidro âmbar. As amostras coletadas devem ser transportadas sob refrigeração até o laboratório para as análises químicas.

Orienta-se que o índice pluviométrico e a temperatura média diária da região sejam obtidos junto às estações meteorológicas do INMET e casas de agricultura, para complementar as informações de condições ambientais.

Procedimentos analíticos com os peixes

Os procedimentos devem seguir um fluxograma que permita a realização de todas as etapas de forma organizada.

Amostragens de peixes e coleta de amostras biológicas a campo

Após a coleta das variáveis da água deverá ser realizada a amostragem dos peixes. O número de peixes a ser amostrado deve ser pré-determinado considerando-se a prevalência das diferentes doenças (CANON et al., 2001), caso já existam tais estudos. Porém, deve-se atentar para o caráter do estudo, se prospectivo ou ativo, considerando o número de propriedades existentes e a operacionalidade de execução das análises, principalmente com relação a quantidade de peixes amostrados.

Os peixes devem ser capturados com auxílio de rede de arrasto ou puçás indicados para o tamanho dos peixes e considerando o tamanho da estrutura de cultivo e das condições locais. Os peixes capturados devem ser transferidos para um recipiente (caixa d'água ou bombona) com água do viveiro, para que sejam mantidos durante as coletas de amostras, estas devem ser realizadas in situ (Figura 2).

Fotos: Marcia Mayumi Ishikawa

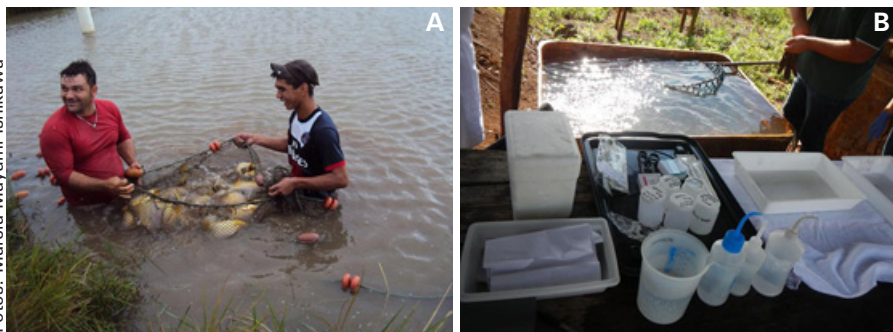


Figura 2. A) Amostragem de peixes de um viveiro com uso de rede de arrasto; B) Estação de coleta montada na piscicultura para realização das análises sanitárias. Observar a caixa de água para manutenção dos peixes durante a coleta de amostras.

Para os exames sanitários deve-se preparar uma estação de trabalho para a realização das coletas de material biológico. Escolher sempre que possível um local fresco (Figura 2), sombreado e coberto para que a coleta de amostras e análises realizadas não sejam comprometidas pelas condições ambientais.

A primeira análise realizada é um exame macroscópico externo do corpo do peixe. Devem ser observadas a presença de corpos estranhos, lesões, alteração de cor, falta de escamas e presença de parasitos externos visíveis.

Caso sejam encontrados parasitos crustáceos, estes deverão ser retirados e acondicionados em frascos com tampa, submersos totalmente em álcool 70% com 10% de glicerina.

Em seguida realiza-se a coleta do muco. Uma amostra do muco é observada entre lâmina e lamínula em microscópio de luz para análise de parasitas monogenéticos, protozoários, etc. Em caso de presença de protozoários, estes deverão ser fixados em álcool metílico em lâminas de microscopia, secos ao ar e corados com Giemsa segundo EIRAS et. al. (2006). O restante do muco corporal é coletado realizando uma raspagem sentido crânio caudal com auxílio de uma lâmina de vidro, e esse conteúdo acondicionado e fixado em frasco com formol a 5% aquecido (55°C) (Figura 3).

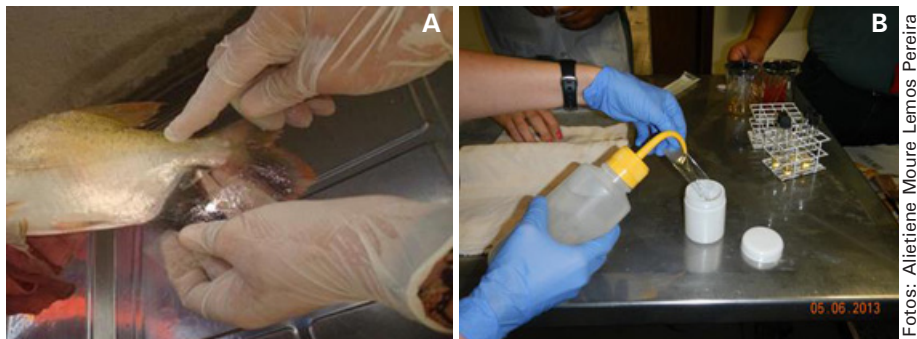


Figura 3. A) Coleta de muco da superfície corporal e B) preparo final da amostra de muco no laboratório.

Na presença de lesões, dois swabs estéreis devem ser utilizados para coletar material da lesão. Após raspagem da lesão, o swab deve ser acondicionado em tubo de ensaio estéril contendo o meio de cultura BHI ou TSA. A preparação dos meios está descrita no tópico análises bacteriológicas.

Envio dos peixes para o laboratório

Após a primeira coleta de material (muco, ectoparasitos visíveis e swab estéril), os peixes devem ser acondicionados individualmente em sacos plásticos (um peixe para cada 20 L de água, ou em caixas de transporte na densidade de cinco peixes para cada 90 L de água) para serem transportados até o laboratório. Deve-se ter atenção de não misturar peixes de viveiros diferentes.

Os peixes devem ser mantidos sob aeração constante ou oxigênio nos sacos plásticos (Figura 4).

É muito importante que todos os peixes e amostras sejam identificados com o auxílio de fitas ou barbantes (Figura 5) no caso de transporte em caixas.

No laboratório os peixes devem ser aclimatados por 30 minutos em recipientes contendo água limpa declorada e separados por viveiro amostrado.

Fotos: Alietiene Moura Lemos Pereira



Figura 4. Peixes embalados individualmente para coleta de amostras em laboratório.

Foto: Alietiene Moura Lemos Pereira



Figura 5. Peixes marcados individualmente com código nos barbantés.

Análises laboratoriais

Quatro estações de trabalho são necessárias para os procedimentos de análise no laboratório:

Estação 1: anestesia e biometria.

Estação 2: coleta de brânquias para parasitologia.

Estação 3: bacteriologia e virologia.

Estação 4: coleta de órgãos internos para parasitologia.

Estação 1. Anestesia e Biometria

Após o período de aclimação os peixes deverão ser eutanasiados com solução de eugenol (60 mg/L) ou benzocaína (20 mg/mL). Nessas concentrações o peixe alcança anestesia profunda em torno de 30 segundos a 1 minuto. Importante ressaltar no caso de projetos de pesquisa submeter o projeto à avaliação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

Os peixes deverão ser retirados da água e contidos com toalhas úmidas em uma mesa.

Os opérculos devem ser suspensos e somente as brânquias aspergidas com a solução anestésica. Recomenda-se a utilização de borrifadores para que não ocorra perda de parasitos para o ambiente.

Com o peixe anestesiado realiza-se a biometria, tomando-se as medidas do peso, comprimento total (cabeça ao final da nadadeira caudal) e padrão (cabeça até o fim do corpo, início da nadadeira caudal) (Figura 6).

Foto: Alletiene Moure Lemos Pereira



Figura 6. Estação de trabalho 1: anestesia e biometria dos peixes.

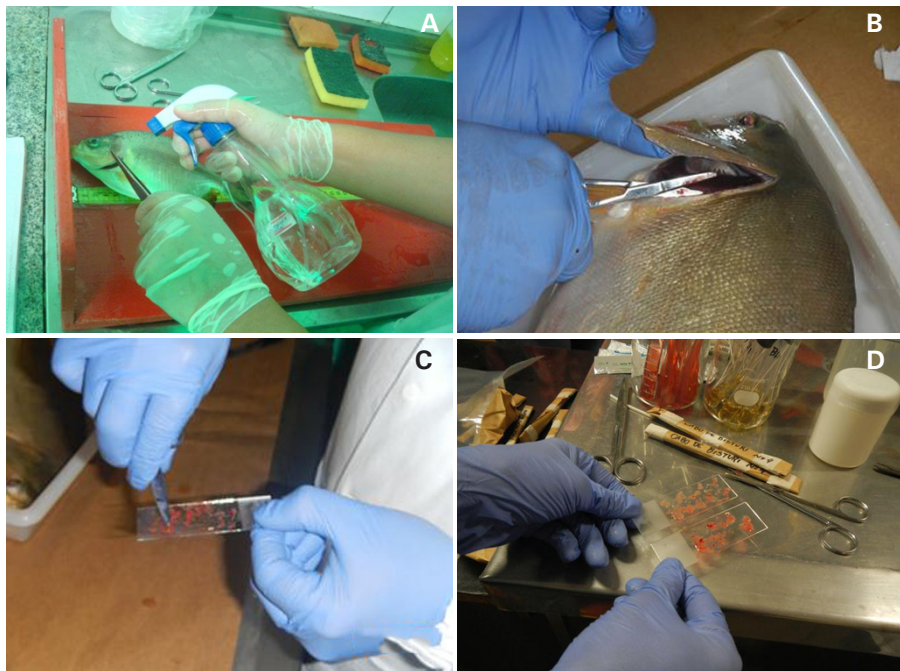
Estação 2. Parasitologia: análise das brânquias

Nesta etapa (Figura 7) realiza-se a sangria do animal procedendo-se com o corte da base opercular próximo às brânquias. Nesse momento devem ser coletados dois fragmentos de brânquias de ambos os lados que serão preparados entre lâmina e lamínula e analisados sob microscopia de luz (Figuras 8A, 8B, 8C e 8D).

Foto: Alletiene Moure Lemos Pereira



Figura 7. Estação de trabalho 2: coleta de brânquias para parasitologia.



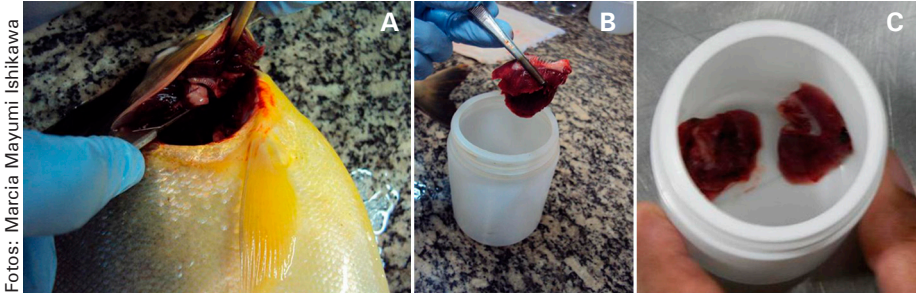
Fotos: Aletiene Moura Lemos Pereira

Figura 8. A) Aspersão de anestésico nas brânquias; B, C e D) amostragem de fragmentos das brânquias e preparo de lâminas.

Em seguida todos os arcos devem ser retirados, separados e colocados em frascos com água destilada ou formol 5% aquecidos a 55 °C para que os parasitas presentes se desprendam do órgão (Figura 9). Ao se utilizar somente água aquecida, após o seu resfriamento deve-se adicionar formol 5% para a conservação da amostra.

Após 48 horas de fixação em formol 5% deve-se proceder a raspagem das lamelas dos arcos branquiais para a contagem dos parasitas presentes sob microscopia de luz.

O número total de monogenóides deve ser quantificado utilizando um estereomicroscópio e placa de Petri. Os parasitos devem ser identificados até o menor nível taxonômico possível com auxílio de literatura específica (THATCHER, 2006).



Fotos: Marcia Mayumi Ishikawa

Figura 9. A) Retirada dos arcos branquiais; B) corte dos arcos individualmente; C) arcos branquiais armazenados para fixação.

Estação 3. Bacteriologia e Virologia

Antes de se passar para esta estação de trabalho (Figura 10), os peixes devem ser lavados com detergente neutro e depois aspergidos com álcool 70% (Figura 11). Esse procedimento se faz necessário para reduzir a contaminação externa do peixe.

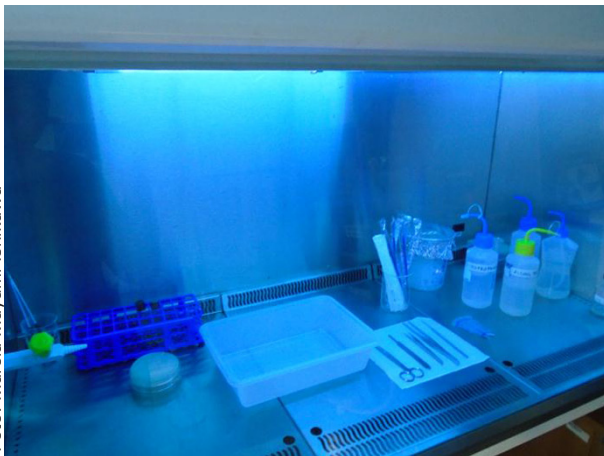
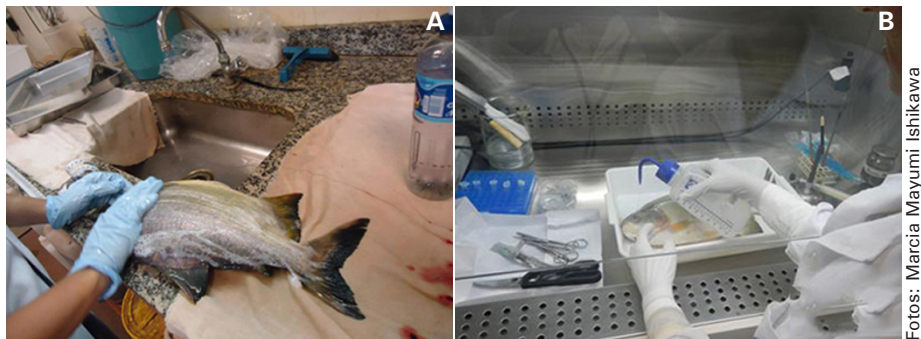


Foto: Marcia Mayumi Ishikawa

Figura 10. Estação de trabalho 3: bacteriologia e virologia.



Fotos: Marcia Mayumi Ishikawa

Figura 11. A) Peixes sendo lavados com detergente antes da entrada na câmara de fluxo laminar e B) aspergidos com álcool 70% já dentro da câmara de fluxo laminar.

A coleta de amostras bacterianas é realizada utilizando swab estéril. Este deve ser colocado em contato com o órgão ou lesão, levemente rotacionado até que toda a sua superfície seja preenchida com material. Os órgãos de eleição para a pesquisa de amostras são cérebro e o rim cranial dos peixes, os quais devem ser assepticamente retirados (KLESIOUS et al., 2000) (Figura 12). O material coletado deverá ser semeado em meios de cultura (líquido e sólido) próprios para cada tipo de suspeita conforme metodologia específica descrita abaixo.



Figura 12. A) Corte abertura para alcance do rim; B) coleta de amostras do rim; C) corte para alcance do cérebro; D) coleta de amostras do cérebro; E) amostras inoculadas em meios de cultura líquidos e F) sólidos.

Cultivo de *Aeromonas hydrophila*

As amostras suspeitas devem ser semeadas em meio “tryptone soy Agar” (TSA) e “brain heart Infusion” (BHI) para visualização do formato e textura da colônia, incubadas por 24 horas a 25 °C e 28 °C, respectivamente. Em seguida, as colônias características são submetidas ao exame de coloração de Gram, motilidade, oxidase e catalase. Uma colônia isolada é então incubada em Tryptone Soy Broth (TSB) nas mesmas condições citadas e então armazenadas com 30% de glicerol a -70 °C.

Cultivo de *Flavobacterium columnare*

O material coletado é semeado em meios de cultura (líquido e sólido) próprios para *F. columnare* modificado por Pilarski et al. (2008) e incubados a 25 °C, por de 24 a 48 horas.

O meio sólido é composto por infuso de filé de peixe 100 mL; extrato de levedura 5,0 mL; acetato de sódio 0,02 g; ágar 2,5 g, pH 6.8 e autoclavado a 121 °C por 15 minutos em volume de 100 ml, distribuídos em placas de Petri para semeadura.

As colônias características são submetidas ao exame de coloração Gram, catalase e oxidase e inoculadas em erlenmeyers contendo 6,0 mL de meio líquido para isolamento de *F. columnare*, composto por infuso de filé de peixe e incubadas a 25 °C por 48 horas. Após obtenção da cultura pura, seu armazenamento é realizado com 30% de glicerol a -70 °C.

Cultivo de *Streptococcus agalactiae*

Os swabs coletados com material das lesões características de rim e encéfalo deverão ser inoculadas em meios de cultura TSB suplementado com sangue desfibrinado de ovelha e repicados ou BA e incubados a 25 °C, por 24 a 48 horas, para visualização do formato e textura da colônia.

As colônias características são submetidas ao exame de coloração de Gram, catalase e oxidase.

As colônias identificadas como *S. agalactiae* são inoculadas em meios de cultivo nutritivos adicionados de glicerol para armazenamento a -80 °C.

Identificação molecular das bactérias

A bactéria selecionada é submetida à extração de DNA para a identificação de sua espécie. A metodologia do PCR é realizada com primers específicos de acordo as descrições de WILSON (1997); CHACÓN et al. (2003); KEYA (2005). Os produtos isolados são submetidos à eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de

etéideo e os fragmentos visualizados sob luz ultravioleta e comparados com padrões de peso molecular para confirmação da identidade dos mesmos.

Análises virológicas

As técnicas descritas têm o objetivo de realizar estudos exploratórios prévios de virologia. Para o isolamento dos vírus são retirados, utilizando material estéril, 0,5 g do rim e 0,5 g do cérebro de cada animal amostrado. Os tecidos deverão ser acondicionados em recipientes estéreis e refrigerados.

Meio de cultura celular comercial de EPC (Efeito Citopático Viral) é utilizado para o isolamento do vírus de peixes suspeitos. A cultura celular é então previamente preparada uma semana antes. O isolamento e a identificação são conduzidos segundo o manual da OIE (2012).

Isolamento de vírus (Septicemia viral hemorrágica, SVCV)

Diluições das amostras virais são inoculadas no cultivo celular para avaliação do EPC.

O efeito citopático viral é evidente no intervalo ente 10 horas e 72 horas da inoculação. Se a amostra continuar negativa para EPC após sete dias, o inoculado celular deverá ser repicado e cultivado por mais sete dias. O sugerido por alguns autores é a identificação do SVCV é por meio de neutralização de anticorpos.

Detecção viral por Teste de Imunofluorescência (IFT) ou por ELISA para SVCV

A amostra isolada suspeita de SVCV é submetida ao IFT por kit ou ELISA, segundo metodologia descrita no manual da OIE (2012).

Diagnóstico dos vírus (IHN, VHS)

O diagnóstico é realizado utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) usando a metodologia e recomendações da Organização Internacional de Epizootias - OIE (2009), disponibilizado no Manual de Diagnósticos para Animais Aquáticos.

O RNA viral retirado de uma amostra fresca é purificado. Um cDNA é feito deste RNA, usando-se uma mistura de transcriptase reversa e nucleotídeos em tampões. O cDNA é amplificado em temperatura de ciclos e o resultado da eletroforese será corado e visualizado em luz UV. A metodologia é utilizada para diferenciar os vírus da VHS e IHN, utilizando-se primers específicos.

Estação 4. Análises parasitológicas

Das amostras de muco e brânquias, a quantificação de protozoários ciliados e dinoflagelados é feita a partir de homogeneização do conteúdo da superfície do corpo e brânquias, retiradas três alíquotas para observação e contagem em câmara de Sedgewick Rafter (Figura 13).

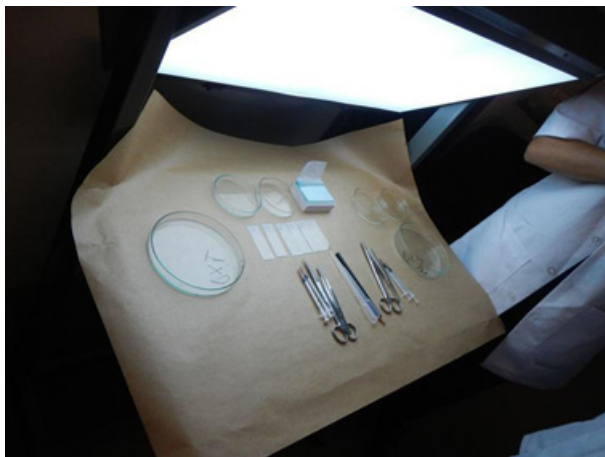


Foto: Aletiene Moura Lemos Pereira

Figura 13. Estação de trabalho 4: coleta de órgãos internos para parasitologia.

Nessa estação de trabalho, os peixes também serão analisados quanto a presença de endoparasitas. Estes devem ser coletados do trato gastrointestinal e órgãos associados (Figura 14), quantificados, fixados e conservados em frascos contendo álcool 70% com 5% de glicerina (Figura 15), segundo recomendações de EIRAS et. al. (2006).



Figura 14. A) Abertura abdominal e exposição dos órgãos; B) exame macroscópico dos órgãos; (C) visualização de alterações (seta); D) coleta de fragmento dos órgãos e E) preparação de lâminas para observação; F) procedimento para limpeza e separação dos órgãos (retirada e excesso de gordura); G) intestino separado.

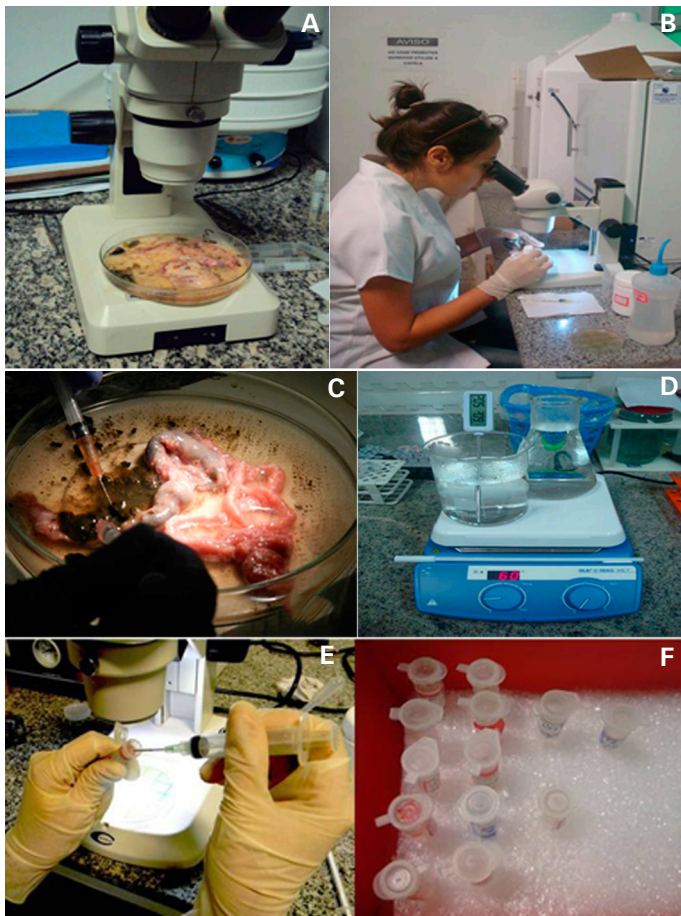


Foto: Alletiene Moure Lemos Pereira

Figura 15. A) Conteúdo para observação em estereomicroscópio; B e C) exame sob estereomicroscópio; D) aquecimento de solução para fixação; E) separação dos parasitos; F) parasitas coletados e fixados.

O número total de endoparasitos por órgão é contabilizado sob estereomicroscópio em placa de Petri (Figura 15A). Os parasitos podem ser diafanizados, corados, medidos, descritos e identificados até o menor nível taxonômico possível (TRAVASSOS et al., 1928; VICENTE e PINTO, 1999; THATCHER, 2006).

Após a quantificação dos parasitas em seus respectivos sítios (muco, brânquias e órgãos internos), devem ser determinados os índices parasitológicos de infestação de acordo com o método proposto por Bush et al., (1997): abundância ($AB = n^{\circ} \text{ total de parasitas} / n^{\circ} \text{ total de hospedeiros}$); intensidade média ($IM = n^{\circ} \text{ total de parasitas} / n^{\circ} \text{ total de hospedeiros infectados}$) e prevalência ($P\% = n^{\circ} \text{ total de hospedeiros infectados} / n^{\circ} \text{ total de hospedeiros}$).

Referências

APHA. **Standard methods for the examination of water and waste water**, 20th ed. Washington: American Public Health Association, Washington DC, 1998. 1325 p.

CANNON, R. M. Sense and sensitivity—designing surveys based on an imperfect test. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, NL, v. 49, 2001, p.141-163.

CHACÓN, M. R.; FIGUERAS, M. J.; CASTRO-ESCARPULLI G, SOLER L. Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 84, 2003, p. 269-278.

EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C. **Métodos de estudo e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes**. 2 ed. revisada e ampliada. Maringá: EDUEM, 2006. 199 p.

FAO. **The State of world fisheries and aquaculture (SOFIA 2012)**. Roma, 230 p.

FUJIMOTO, R. Y.; CASTRO, M. P.; MORAES, F. R.; Gonçalves, F. D. **Efeito da suplementação alimentar com cromo trivalente em pacu, *Piaractus mesopotamicus* (holmberg, 1887), mantido em diferentes densidades de estocagem**. Parâmetros fisiológicos. São Paulo: Instituto de Pesca, 2005, p. 155 - 162.

KEYA S. Development of a rapid identification method for *Aeromonas* species by multiplex-PCR. **Canadian Journal of Microbiology**, Otawaa, v. 51, 2005, p. 957-966.

KLESIUS PH, SHOEMAKER CA, EVANS JJ. 2000. Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, Amsterdam, NL, v. 188, p. 237-246.

NUSCH, E. A. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. **Archiv für Hydrobiologie–BeiheftErgebnisse der Limnologie**, 1980, v. 4, p.14-36.

OIE-World Organization for animal health. **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals**. 2012. 554 p.

PILARSKI, F.; ROSSINI, A. J. ; CECCARELLI, P. S. Isolation and characterization of *Flavobacterium columnare* from four tropical fish species in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 68, n. 2, 2008, p. 409-414.

THATCHER V.E. **Amazon fish parasites**. 2. ed. Moskow: Pensoft Publisher Sofia, 2006. 507 p.

TRAVASSOS, L.; ARTIGAS, P.; PEREIRA, C. Fauna helminthologica dos peixes de água doce do Brasil. **Archivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 1, 1928, p. 5-68.

VICENTE, J. J.; PINTO, R. M. Nematóides do Brasil: nematóides de peixes atualização: 1985-1998. **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v. 16, n. 3, 1999, p. 561-610.

WILSON I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied. Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 63, 1997, p. 3741-3751.

Anexos

Anexo 1. Questionário relativo a diversas áreas da produção que servirá como guia para aplicação pelo entrevistador

QUESTIONÁRIO PROJETO AQUASEC
Aquasec- Rede de pesquisa em epidemiologia das principais enfermidades bacterianas, virais e parasitárias de peixes redondos: tambaquis, nos polos produtivos de Rio Preto da Eva (AM), Baixo São Francisco (AL/SE), e pacus na região da Grande Dourados (MS), e os fatores de risco associados.

IDENTIFICAÇÃO DO COLETOR DE DADOS
Data da aplicação do questionário:
Nome do responsável pelo preenchimento:

IDENTIFICAÇÃO DA PROPRIEDADE
Número da ficha:
Indicação do polo de produção: <input type="checkbox"/> Amazonas <input type="checkbox"/> Mato Grosso <input type="checkbox"/> Baixo São Francisco
Nome do entrevistado: _____
<input type="checkbox"/> proprietário <input type="checkbox"/> encarregado <input type="checkbox"/> outro
Nome da propriedade:
Endereço da propriedade:
Telefone/e-mail:
Coordenadas: DATUM side 69: Latitude ou Eixo y: Latitude ou Eixo x:

PARTE 1: Dados da região onde se encontra a propriedade aquícola
1) Existe muita variação de temperatura durante o ano? <input type="checkbox"/> Não. <input type="checkbox"/> Sim.
2) Houve registro de falta de água nos últimos 3 anos (ou mais) na região? <input type="checkbox"/> Não. <input type="checkbox"/> Sim. Com que frequência? <input type="checkbox"/> Anualmente. Em que meses? () J () F () M (

)A ()M ()J ()J ()A ()S ()O ()N ()D

() Esporadicamente dependendo do ano.

3) Existem outros empreendimentos aquícolas **no entorno** da propriedade?

() Não.

() Sim. Que tipo de empreendimento:

() camarão marinho

() camarão de água doce

() quelonicultura

() peixe. Qual(is) espécie(s)? () tambaqui

() pacu

() híbridos de redondos

() pintado

() cachara

() híbridos de bagres (jundiara ou pintado da Amazônia, "ponto e vírgula")

() pirarucu

() tilápia

() outros

4) Existem lavouras/pecuária **no entorno** da propriedade?

() Não.

() Sim. Que tipo de cultivo? () fruteiras

() hortaliças

() pasto

() cana

() grãos

() algodão

() outros _____

5) Se sim (*na pergunta 4*), este cultivo utiliza algum produto químico (herbicida ou inseticida)?

() Não.

() Sim. Qual

(is)? _____

6) Se sim (*na pergunta 4*), este cultivo **externo** está próximo à fonte de abastecimento de água da propriedade?

() Não.

() Sim.

7) Qual a distância entre a lavoura/pecuária e a piscicultura? _____ metros

8) Na propriedade, que tipo de solo predomina na área da piscicultura?

() argiloso (massa de solo na mão forma blocos compactos após

- () pirarucu () tilápia
() outros. Quais? _____

16) Quais as etapas do cultivo realiza na propriedade?

- () Reprodução () Larvicultura () Alevinagem () Engorda
() Processamento

17) PARA O TAMBAQUI/PACU, quais etapas do cultivo realiza na propriedade?

- () Reprodução () Larvicultura () Alevinagem () Engorda
() Processamento

18) Qual é a posição dos tanques de alevinagem e recria (berçários) em relação aos demais?

- () não faz alevinagem e recria (berçário).
() ao lado dos tanques de engorda.
() antes dos tanques de engorda.
() depois dos tanques de engorda.
() a posição varia de acordo com a disponibilidade de tanques livres para uso na propriedade.

19) No caso da engorda, qual o sistema de produção de acordo com uso das espécies?

- () Monocultivo.
() Policultivo (*dentro da água, mais de uma espécie de peixe*).
Citar espécies de peixes: _____
() Consórcio (*fora da água, associação com mamíferos, aves, cultivos vegetais*).

Citar espécies animais: _____

20) Quantas estruturas de cultivo e o tamanho total tem na propriedade?

(*No parênteses anotar o número existente de cada estrutura. Na linha a área total de lâmina de água de cada tipo de estrutura em metros quadrados*).

() Viveiro: _____ m²

() Barragem ou represa (*barra rio, igarapé*): _____ m²

() Tanque-rede. Volume das estruturas: _____ m²

() Açude (*água de chuva*): _____ m²

21) Qual o formato da maioria das estruturas de cultivo?

- () retangulares () quadradas () circulares

- () heterogêneas
- 22) Qual o formato das estruturas de cultivo do tambaqui/pacu?
() retangulares () quadradas () circulares
() heterogêneas
- 23) Os taludes dos tanques/viveiros estão erodidos?
(Não precisa perguntar, apenas observar e anotar)
() Não.
() Sim. Observação pertinente: _____
- 24) As cristas dos tanques/viveiros têm plantações?
(Não precisa perguntar, apenas observar e anotar)
() Não. () Sim. Qual tipo? _____
- 25) Os tanques/viveiros apresentam macrófitas no entorno ou em seu interior?
(Não precisa perguntar, apenas observar e anotar)
() Não.
() Sim. Que tipo? *(tentar fotografar)* _____
- 26) Existem curvas de nível na propriedade para evitar entrada de enxurradas nos tanques/viveiros?
() Não.
() Sim. Observação pertinente: _____
- 27) Os tanques/viveiros têm entrada e saída de água individual?
() Não.
() Sim. Observação pertinente: _____
- 28) A forma de abastecimento de água nos viveiros/tanques é feito em cascata ou em série?
() Não.
() Sim. Observação pertinente: _____
- 29) Por onde é feita a saída de água **para esgotamento** dos tanques/viveiros?
() retirada e água por cima.
() retirada e água por baixo.
- 30) Como é o sistema de escoamento da água dos tanques/viveiros?
() superficial no lado oposto a entrada de água.
() superficial no mesmo lado da entrada de água.
() por monge.
() por sifão interno (com ou sem camisinha/charuto).
() por sifão externo.
- 31) Realiza algum tratamento da água de drenagem?
() Não.
() Sim. Qual? _____

32) Existe galpão ou sala de ração?

() Não.

() Sim. Observação pertinente: _____

33) Existe energia elétrica na propriedade?

() Não.

() Sim. Observação pertinente: _____

34) A propriedade possui aerador?

() Não.

() Sim. Obs. (quantos/de que tipo):

PARTE 3 - Aquisição de formas jovens

35) Origem dos alevinos/pós larvas:

() Comprados no mesmo estado da piscicultura.

() Comprados em outro estado. Qual? (inserir opções com as UF)

36) De quem adquire os alevinos?

() Sempre do mesmo fornecedor. Qual? _____

() Varia o fornecedor. De quais adquire? _____

37) Conhece a propriedade e o histórico da fazenda fornecedora dos alevinos?

() Sim. () Não.

38) Qual é o critério para escolha do fornecedor de alevinos?

() É o único na região.

() Indicação de outro produtor.

() Menor preço.

() Escolhe o fornecedor que tem alevinos na época desejada.

39) Já recebeu lotes com mais problemas que outros?

() Não.

() Sim.

40) Se sim (*na pergunta 39*), quais os tipos de problema?

() mortalidade

() deformidade, cauda ou coluna tortas

() machucados/feridas

() baixo crescimento

() heterogeneidade

() outros. _____

41) O fornecedor apresenta algum tipo de certificado que ateste a saúde dos alevinos comprados?

() Não. () Sim.

42) Você (o produtor) faz algum tipo de análise nos peixes que entram na propriedade?

() Não. () Sim.

PARTE 4 - Qualidade da água

43) Monitora a qualidade de água dos viveiros?

() Não.

() Sim. Faz análise no início do cultivo.

() Sim. Adequa a água ao cultivo da espécie alvo (tambaqui/pacu).

44) Analisa as variáveis com que frequência?

() Semanalmente.

() Mensalmente.

() Analisa sob demanda (quando precisa).

() Não analisa.

45) Faz monitoramento de quais parâmetros de qualidade de água dos tanques? Como faz? (*escrever na linha ao lado*)

() Transparência _____

() Oxigênio _____

() pH _____

() Temperatura _____

() Alcalinidade _____

() Amônia _____

() Nitrito _____

() Outro _____

46) Qual é a origem da fonte de água da propriedade?

() Rio () Igarapé () Poço () Nascente () Açude (água de chuva)

() Barragem de rio (represa)

47) Como é feito o abastecimento de água?

() Gravidade

() Bombeamento

() Outro. _____

48) Realiza algum tratamento na água de abastecimento dos tanques/viveiros?

() Não.

() Sim. Qual? _____

49) Faz renovação de água dos tanques/viveiros?

() Não.

() Sim. Qual taxa de renovação?

() renova o quanto evapora

- renova quando tem problemas no tanque/viveiro
- se souber a taxa (%) de renovação registrar
- outro

PARTE 5 - Manejo

50) A mão-de-obra da propriedade é treinada ou capacitada?

- Sim. Recebem treinamento na propriedade.
- Sim. São contratados apenas com experiência prévia.
- Sim. Mão-de-obra familiar.
- Não.

51) Faz calagem nos tanques/viveiros antes do povoamento?

- Não.
- Sim. O que utiliza?
 - Calcário dolomítico
 - Calcário calcítico
 - Cal virgem
 - Cal hidratada
 - Outro _____

52) Fertiliza/aduba os tanques/viveiros antes do povoamento?

- Não.
- Sim. O que utiliza? *(pode marcar uma ou mais opções)*
 - Adubo químico (N, P, K)
 - Farelo de arroz ou trigo
 - Cama de frango
 - Esterco bovino
 - Outro _____

53) Faz biometria dos peixes?

- Não.
- Sim. Semanalmente.
- Sim. Quinzenalmente.
- Sim. Mensalmente.
- Sim. Com frequência variável. Quando? _____

54) Utiliza anestésico no manejo?

- Não.
- Sim. Qual? _____

55) Utiliza sal?

- Não.
- Sim. Em quais momentos utiliza?
 - Para preparação do viveiro.
 - Periodicamente no tanque.
 - Nas biometrias.

- () Na chegada dos peixes na propriedade.
- () Quando há manipulação dos peixes: classificação, transferência e biometria.
- () Quando aparecem doenças.
- () Outros _____

56) São feitas observações periódicas dos tanques/viveiros?

- () Não repara no tanques/viveiros.
- () Sim. Diária.
- () Sim. Semanal.

57) Possui filtro ou tela no local de captação de água da propriedade?

- () Não. () Sim.

58) Possui filtro ou tela na entrada de água dos tanques/viveiros?

- () Não. () Sim.

59) Pratica alguma prevenção contra aves?

- () Não. () Sim. Qual? _____

60) Existem casos de predação dos peixes?

- () Não. Qual a proteção utiliza para evitar?

- () Sim. Qual é o predador? _____

61) Qual a densidade dos tanques? *(Deve ser respondida para cada um dos 3 tanques estudados)*

Tanque 1: _____

Tanque 2: _____

Tanque 3: _____

Média da propriedade: _____

PARTE 6 - Alimentação

62) Utiliza ração?

- () Não. () Sim. Qual(is) marca(s)?

63) No que se baseia a escolha da marca da ração? *(Pode marcar mais de uma opção)*

- () Exigência da espécie.
- () Cor e cheiro.
- () Preço.
- () Facilidade de compra.
- () Melhor desempenho dos peixes.
- () Melhor relação custo benefício.

64) Quanto à ração: qual o tamanho do pellet e % proteína bruta (PB)

utilizado **na recria**?

_____ mm

_____ % PB

65) Quanto à ração: qual o tamanho do pellet e % proteína bruta (PB)

utilizado **na engorda**?

_____ mm

_____ % PB

66) Como sabe a quantidade de ração a ser administrada no tanque/viveiro?

Não sei a quantidade.

Calcula a quantidade de acordo com dados das biometrias.

Não calcula. Oferece ração à vontade até a saciedade aparente dos peixes.

Outro _____

67) Utiliza subprodutos?

Não.

Sim. Qual?

milho

soja

outros _____

68) Com que frequência oferece os subprodutos?

Todos os dias complementando a ração.

Quando o preço da ração está alto.

Quando acaba a ração.

Outro _____

69) Como é o armazenamento das rações?

(não precisa perguntar, pode ser observado in loco na propriedade para marcar a opção)

Local fresco e arejado.

Local úmido sem ventilação.

Local fresco e arejado porém saco no chão ou encostado nas paredes.

Local úmido sem ventilação e com saco no chão ou encostado na parede.

Não tem local fixo para armazenar.

70) Já observou rações com cheiro azedo ou formando grumos?

Não. Sim.

71) A ração é comprada com que frequência? *(depois, relacionar a resposta ao tamanho do empreendimento)*

- () Semanalmente.
- () Quinzenalmente.
- () Mensalmente.
- () Bimestralmente.
- () Trimestralmente.
- () De acordo com a demanda.

PARTE 7 - Doenças

72) Já teve ocorrência de doenças na propriedade?

- () Não. () Sim. Qual doença? _____

73) Já observou algum destes comportamentos nos peixes? (*Pode marcar mais de uma opção*)

- () lentos, sem reação à captura.
- () próximos a entrada da água.
- () raspagem na lateral do tanque/viveiro.
- () mudança de cor.
- () não se alimentam.
- () presença de corpos estranhos na superfície do corpo.
- () machucados ou pontos vermelhos no corpo.
- () tufos brancos no corpo.
- () isolados do cardume.
- () natação na superfície da lâmina de água.
- () outro _____

74) Existe **alguma época do ano** em que morrem mais peixes?

- () Não. () Sim. Quando? (estação/meses) _____

Já foi observado algum comportamento ou sinal nos peixes nessa época do ano?

- () Não.
- () Sim. Quais? () lentos, sem reação à captura.
 - () próximos a entrada da água.
 - () raspagem na lateral do tanque/viveiro.
 - () mudança de cor.
 - () não se alimentam.
 - () presença de corpos estranhos na superfície do corpo.
 - () machucados ou pontos vermelhos no corpo.
 - () tufos brancos no corpo.
 - () isolados do cardume.
 - () natação na superfície da lâmina de

água.

() outro _____

75) Existe **uma fase de desenvolvimento** em que morrem mais peixes?

() Não () Sim. Qual o tamanho? _____

Já foi observado algum comportamento ou sinal nos peixes nessa época do ano?

() Não.

() Sim. Quais? () lentos, sem reação à captura.

() próximos a entrada da água.

() raspagem na lateral do tanque/viveiro.

() mudança de cor.

() não se alimentam.

() presença de corpos estranhos na su-

perfície do corpo.

() machucados ou pontos vermelhos no

corpo.

() tufo branco no corpo.

() isolados do cardume.

() natação na superfície da lâmina de

água.

() outro _____

76) Qual o destino dado aos animais mortos?

() deixa no tanque que outros animais comem.

() retira e joga no lixo comum.

() retira e enterra.

() retira e queima.

() retira e joga em algum lugar na propriedade.

() retira e joga para os animais silvestres (aves, mamíferos).

() retira e joga para cão e gato.

77) Existe uma área de quarentena na piscicultura?

() Sim.

() Não. Por quê? () custo é alto.

() não sabe o que é isso.

() não sabe como fazer.

() não tem espaço.

() não acha importante.

78) Faz aclimação dos peixes?

() Não. () Sim.

79) Joga a água de transporte no tanque/viveiro da propriedade?

() Não. () Sim.

80) Faz desinfecção dos tanques/viveiros?

() Não.

() Sim. Com o quê? () Calcário.

() Cal virgem.

() Cal hidratada.

() Outro _____

81) Quando faz a desinfecção dos tanques/viveiros?

() Durante o enchimento do viveiro.

() Quando o viveiro está seco.

() Quando o viveiro está cheio.

() Outro _____

82) Faz desinfecção dos utensílios como rede, baldes, tarrafas e puçás?

() Não.

() Sim. Com qual produto? _____

Com que frequência faz? () logo após o uso.

() antes do uso.

() antes e depois do uso.

() semanalmente.

() outro.

83) Faz raspagem do fundo do tanque/viveiro entre um ciclo e outro?

() Não.

() Sim.

84) Utiliza ou já utilizou algum medicamento ou produto químico nos tanques/viveiros?

() Sim. Apenas quando os peixes estão doentes.

() Sim. Sempre que existe possibilidade dos peixes ficarem doentes (antes de algum manejo, no inverno, antes ou durante o manejo).

() Sim. Apenas quando existe recomendação de um técnico especializado.

() Não.

85) Se sim, qual(is) o(s) produto(s) utilizado(s) e dose?

PARTE 8 - Assistência técnica

86) Possui assistência técnica especializada?

() Não.

() Sim. Possui um técnico contratado.

() Sim. Pessoa da família é formada em área afim.

Sim. Técnico de cooperativa, empresa ou equivalente faz assistência esporadicamente.

Sim. Chamo um técnico quando tem algum problema.

87) Quando chama um técnico, o faz com qual frequência?

Semanal.

Mensal.

Por demanda (quando precisa).

O técnico vive na propriedade ou vai trabalhar todos os dias.

Somente no início do cultivo.

88) Existe assistência técnica específica para doenças e sanidade?

Não. Sim.

PARTE 9 - Comercialização

89) Para onde vende o peixe?

Feira Frigorífico/Entrepósito de pescado Supermercado.

Direto ao consumidor Atravessador.

90) Existe algum controle sanitário na venda?

Não. Sim. Qual? _____

91) Qual a forma de comercialização do pescado:

Peixe vivo ou morto para entreposto de pescado.

Peixe vivo para consumo.

Peixe processado. Se processado, qual a forma de processamento do pescado?

inteiro (com vísceras) eviscerado (sem vísceras).

filé de peixe outros cortes e preparações.

pescado fresco pescado congelado.

Anexo 2. Protocolos para avaliação da água

Protocolo para determinação de fósforo total

Fonte: adaptado de Apha, 1998

Preparo dos reagentes de trabalho

Reagente 1. Solução de fenolftaleína

Dissolver 0,5g de fenolftaleína ($C_{20}H_{14}O_4$) em 50 mL de álcool etílico 95% e 50 mL de água destilada. Adicione 0,02N de hidróxido de sódio (NaOH) (0,8g NaOH/L de água destilada) até a cor rosa desaparecer. Conservar em geladeira.

Reagente 2. Solução de ácido sulfúrico

Coloque 600 mL de água destilada em um balão de 1.000 mL. Vagarosamente coloque 300 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado e complete para 1.000 mL com água destilada. Deve ser preparada no dia da análise.

Reagente 3. Solução persulfato de potássio

Dissolver 10 g de persulfato de sódio ($Na_2S_2O_8$) em 200 mL de água destilada. Esta solução deve ser preparada no dia da análise.

Reagente 4. Solução de hidróxido de sódio

Dissolver 80 g de hidróxido de sódio (NaOH) em água destilada e diluir para 1000 mL em um balão. Estocar em pote plástico.

Reagente combinado

1º Solução de ácido sulfúrico, 5N:

Diluir 70 mL de ácido sulfúrico concentrado com água destilada

em um balão de 500 mL. Espere a solução esfriar em temperatura ambiente e complete o volume. Lembre-se de preparar esta solução em capela para evitar inalação de gases.

2º Solução de tartarato antimônio de potássio

Dissolver 1,37515 g de tartarato antimonil de potássio ($C_8H_4K_2O_{12}Sb_2 \cdot 3H_2O$) em 400 mL de água destilada. Estocar em pote com tampa de vidro.

3º Solução de molibdato de amônia:

Dissolver 20 g de molibdato de amônia ($(NH_4)_6MO_7O_{24}$) em 500 ml de água destilada. Estocar em pote plástico a 4 °C (geladeira).

4º Solução de ácido ascórbico

Dissolver 1,76 g de ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$) em 100 mL de água destilada. Esta solução é estável por uma semana a 4 °C (geladeira). Adicionar data da preparação da solução no rótulo do preparado.

Reagente combinado

Misture os quatro reagentes acima na proporção e sequência dadas abaixo para obter 100 mL da solução. Todos os reagentes devem estar à temperatura ambiente no momento da mistura.

- 50 mL da solução de ácido sulfúrico 5N.
- 5 mL da solução de tartarato antimonil de potássio.
- 15 mL da solução de molibdato de amônia.
- 30 mL da solução ácido ascórbico.

Preparo da solução padrão de fósforo (0,010 M)

Solução mãe: dissolver 0,2195 g de fosfato monopotássico (KH_2PO_4) em água destilada e diluir para 1.000 mL em balão volumétrico.

Solução filha: diluir 50 ml da solução mãe para 500 mL de água destilada em um balão volumétrico.

Procedimentos de análise

Limpeza da vidraria e tratamento do filtro:

Toda vidraria que será utilizada na análise deve ser cuidadosamente limpa, a fim de prevenir contaminação por fósforo. Antes do uso enxágue toda vidraria com uma solução 1 N de HCl, depois lave com detergente e água e depois enxágue com água destilada. Mais tarde, lave novamente com detergente e água e depois enxágue com água destilada, novamente. O detergente deve ser livre de fósforo (exemplo extran).

Preservação da amostra

Sempre que possível faça a análise duas ou três horas após a coleta, porque as bactérias que crescem no frasco de coleta irão remover o fósforo da água. Para aumentar o tempo entre a coleta e a análise, os frascos de coleta devem ser limpos da seguinte forma: prepare uma solução contendo 50 g de iodo/L e 80 g de iodeto de potássio/L e deixe descansar por uma semana (Esta solução pode ser preparada para ser usada várias vezes). A vidraria deve ser limpa com esta solução e depois de limpa, vigorosamente enxaguada com

água destilada. Amostras coletadas em vidraria limpa desta forma duram até sete dias.

Marcha analítica

Etapa 1. Digestão

Misture a mostra e coloque 50 mL em Erlenmeyer de 125 mL. Coloque 1 gota de fenolftaleína. Se a amostra ficar na cor rosa adicione solução de ácido sulfúrico (reagente 2) até a cor desaparecer. Coloque 1 mL da solução de ácido sulfúrico (reagente 2) e 10 mL da solução de persulfato de potássio. Cubra o frasco com papel laminado e autoclave por 30 minutos.

Etapa 2. Preparo do digerido para análise (neutralização e diluição)

Após a amostra esfriar, coloque 1 gota de fenolftaleína. Titule com a bureta solução de hidróxido de sódio até a cor rosa aparecer. Transfira o digerido neutralizado para uma proveta de 100 mL (anote o valor) e complete para 100 mL com água destilada.

Etapa 3. Determinação do fósforo

Prepare 25 mL da amostra digerida/neutralizada/diluída em frasco. Adicione 1 gota do indicador de fenolftaleína na amostra. Se ficar da cor vermelha adicione ácido sulfúrico 5N até remover a cor (normalmente 1 gota é o suficiente). Em seguida, coloque 4 mL do reagente combinado e agite. Após dez minutos, porém antes de 30 minutos, ler em espectrofotômetro em 880nm.

Uma amostra com 50 mL de água destilada deve passar por todo processo de digestão, neutralização e diluição. Esta amostra será o branco. Recomenda-se realizar as análises em triplicata.

Gráfico de calibração a partir da solução padrão

Use a solução filha para preparar uma série de concentrações diferentes.

Fosfato-fósforo (mg/L)	mL da solução filha (diluir para 100 mL)
0,00	0,0
0,05	1,0
0,10	2,0
0,25	5,0
0,50	10,0
10,0	20,0

Uma amostra com 50 mL de cada padrão deve passar por todo processo de digestão, neutralização e diluição. Recomenda-se realizar as análises em triplicata.

Protocolo para determinação da dureza total

Fonte: adaptado de APHA, 1998

Preparo dos reagentes de trabalho

Reagente 1. Solução tampão (buffer)

Dissolver 67,5 g de cloreto de amônio (NH_4Cl) em 570 mL de hidróxido de amônio (NH_4OH) concentrado. Diluir para 1 litro em um balão volumétrico com água destilada.

Reagente 2. Solução Indicador de Eriocromo Negro-T (Eriochrome black-T)

Dissolver 4,5 g de hidrocloreto de hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$) e 0,5 g de Eriocromo negro-T ($\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_7\text{SNa}$) em 100 mL de etanol a 70%. Este indicador tem validade de três meses.

Reagente 3. Solução padrão de cálcio (0,010 M)

Transferir 1 g de carbonato de cálcio anidro (CaCO_3) para um béquer de 1 litro. Adicionar ácido clorídrico (HCl) na proporção de 1:1. Diluir para 200 mL com água destilada. Ferver por 5 a 10 minutos e deixar esfriar. Este procedimento serve para liberar o CO_2 da solução. Aferir o pH para 7,0 com uma solução de NH_4OH 3N. Completar para 1 litro em um balão volumétrico. Lembre de preparar esta solução em capela para evitar inalação de gases.

Reagente 4. Solução padrão de EDTA

Dissolver 4 g de EDTA (ácido etilenodiamina tetraacético dissódico) e 100 mg de cloreto de magnésio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) em 1 litro de água destilada. Esta solução deve ser padronizada depois com a solução padrão de cálcio. Pipetar 10 ml da solução padrão de cálcio em um béquer de 250 mL e adicionar 90 mL de água destilada. Titular a

solução padrão de cálcio com a solução de EDTA de acordo com o procedimento a seguir.

Marcha analítica

Colocar 100 mL de água (amostra) em um Erlenmeyer de 250 mL. Adicionar 2 mL de solução tampão (buffer) e misturar. Em seguida, adicionar 8 gotas de Eriocromo Negro-T e titular com solução de EDTA até o End Point (ponto de mudança de cor). A solução deverá mudar de vermelho vinho para azul puro.

Cálculo da Dureza total (mg de CaCO₃/L)

$$Dureza\ total = \frac{(\text{volume (mL) do titulante}) (M) (100,1) (1.000)}{\text{Volume da amostra (mL)}}$$

Observação: as amostras devem ser processadas o mais rapidamente possível. A titulação deve ser conduzida imediatamente após a adição do tampão e do indicador.

Protocolo para determinação de nitrito (NO_2)

Fonte: adaptado de APHA, 1998

Preparo dos reagentes de trabalho

Reagente 1. Solução de sulfanilamida ($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$)

Adicionar lentamente 10 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado em 60 mL de água destilada e resfriar em banho-maria. **Obs:**

Adicionar primeiro a água e depois o ácido clorídrico lentamente.

Quando a solução ácida estiver fria, adicionar 1 g de sulfanilamida. Completar com água destilada até 100 mL. Estocar em vidro escuro. Esta solução tem validade de quatro semanas.

Reagente 2: Solução de N-Naftil

Dissolva 500 mg de N-(1-NAFTIL) etilenodiamina dicloridrato em 500 mL de água destilada. Guarde em frasco escuro longe da luz. Solução é estável por quatro semanas.

Preparo do padrão

Solução mãe: dissolver 0,5024 g de nitrito de sódio (NaNO_2) em 1.000 mL de água destilada. Esta solução mãe tem concentração de 100 mg/L nitrito (NO_2). Adicionar uma gota de clorofórmio (CHCl_3) e guardar a solução em frasco escuro. Este padrão é estável por dois meses.

Solução filha: pipete 10 mL da solução mãe em 1.000 mL de água destilada em um balão volumétrico. Esta solução contém 1 mg/L NO_2 .

Quantidade de nitrito (mg)	Quantidade (mL) da solução filha para 50 ml de água destilada
0,000	0,0
0,005	0,5
0,01	1,0
0,02	2,0
0,04	4,0
0,06	6,0
0,10	10,0

Procedimentos de análise

Filtre a amostra de água em filtro Whatman 42. Adicione 50 mL do filtrado em um béquer de 100 mL. Coloque 1 mL da solução de sulfanilamida, agite e espere de 2 a 4 minutos (não mais que isso) para reação. Coloque 1 mL da solução N-Naftil e agite. Espere 10 minutos, transfira para uma cubeta de 1 cm. Faça a leitura no espectrofotômetro em 543 nm. Mesmo procedimento com reagentes 1 e 2 deve ser realizado com água para ser o branco. Recomenda-se realizar as análises em triplicata.

Protocolo para determinação de amônia total

Fonte: adaptado de Apha, 1998

Preparo dos reagentes de trabalho

Reagente 1. Solução oxidante

Misturar 20 mL de água sanitária com 80 mL de água deionizada e ajustar para pH 6,5–7,0 com uma solução composta por uma parte de HCl e três partes de água destilada. Este reagente deve ser preparado no dia da análise.

Reagente 2. Solução de sulfato de manganês

Dissolver 50 mg (0,05 g) de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ em 100 mL de água deionizada. Este reagente deve ser preparado a cada 4 semanas.

Reagente 3. Solução de fenol

Dissolver 2,5 g de NaOH e 10 g de fenol em 100 mL de água. Este reagente deve ser preparado no dia da análise.

Reagente 4. Solução padrão de amônia

Pese 0,3816 g de NH_4Cl e dilua para 100 mL de água deionizada. Esta será a solução mãe com 1.000 mg/L de amônia. Dilua uma alíquota de 5 mL da solução mãe e complete para 500 mL de água deionizada para ter uma solução com 10 mg/L (solução filha). A solução mãe pode ser estocada por vários dias, e a solução filha e os padrões devem ser feitos no dia da análise.

Volume da solução filha (mL)	Água deionizada (mL)	Concentração final
0,1	9,9	0,1
0,5	9,5	0,5
1,0	9,0	1,0
1,5	8,5	1,5
2,0	8,0	2,0

Procedimentos de análise

Pipete 10 mL da amostra em um béquer de 50 mL e agite em um agitador magnético. Enquanto estiver agitando acrescentar uma gota da solução de sulfato de manganês, 0,5 mL da solução oxidante e 0,6 mL da solução de fenol. A solução de fenol deve ser rapidamente colocada. Remova o Béquer da agitação e espere 15 minutos para desenvolver a coloração máxima. Ler em espectrofotômetro com comprimento de onda de 630 nm.

Observação 1: o mesmo procedimento deve ser adotado para o branco. Neste caso a amostra deverá ser 10 mL de água deionizada.

Observação 2: toda a vidraria utilizada na análise deve ser previamente lavada em solução sulfocrômica e em seguida enxaguada com bastante água destilada.

Preparo da solução sulfocrômica

Dissolver 100 gramas de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) em quantidade mínima de água e completar o volume até 1.000 mL com ácido sulfúrico concentrado. Deve-se conservar a solução em vidro

escuro provido de rolha esmerilhada. Devido alta reatividade desta solução na manipulação e preparo, devem ser observados:

1. Uso de luvas e borrachas.
2. Dissolver o dicromato em água e depois adicionar o ácido cuidadosamente para evitar respingos, sob contínua agitação.
3. Antes de adicionar o ácido, colocar o recipiente em água fria para evitar super aquecimento.
4. Quando a solução sulfocrômica ficar esverdeada, deve ser substituída.

Protocolo para determinação da alcalinidade total

Fonte: adaptado de Apha, 1998

Preparo dos reagentes de trabalho

Reagente 1. Solução indicadora de metil laranja:

Dissolver 0,05 g de metil laranja ($C_{14}H_{14}N_3NaO_3S$) em 100 mL de água destilada.

Reagente 2. Solução de titulação - ácido sulfúrico a 0,022 N

Diluir 2,8 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado em 1 litro de água destilada livre de CO_2 (solução 0,1 N). Em seguida, diluir 200 mL de H_2SO_4 0,1 N em 1 litro de água destilada livre de CO_2 . Esta solução estará a aproximadamente 0,02 N.

Procedimentos para determinação da alcalinidade total

Colocar 100 mL de amostra em um béquer de 250 mL. Adicionar o número de gotas de metil laranja pré-estabelecidos na padronização (5) e, titular com solução padrão de ácido sulfúrico H_2SO_4 (0,02 N) até aparecer coloração laranja fraca.

Cálculo da Alcalinidade total (mg/L):

$$\text{Alcalinidade total} = \frac{\text{mL da solução padrão de } H_2SO_4 * N * (0,022) * (0,5) * (1,00)}{\text{volume da amostra (100 mL)}}$$

Protocolo para determinação de clorofila-a

Fonte: Nusch, 1980

Preparo dos reagentes de trabalho

Reagente 1. Solução de Acetona 90%

Misturar 10 mL de água destilada em 90 mL de acetona (C₃H₆O).

Reagente 2. Solução de Carbonato de magnésio

Colocar 1 g de carbonato de magnésio (MgCO₃) e diluir para 100 mL. Apenas uma pequena porção do reagente vai dissolver.

Procedimentos de análise

Prepare o sistema de filtragem com um filtro de fibra de vidro. Agite a solução 2 e adicione 1 mL no filtro. Aplique vácuo para retirar o excesso da solução. Misture bem a amostra e transfira 100 mL para ser filtrado. Após a filtragem retirar o filtro e cortar as bordas que não foram impregnadas pela clorofila. O amasse e filtro e coloque no triturador de tecido (tissue grinder). Adicione 2 mL da solução 1 e triture por 1 minuto. Depois, adicione mais 8 mL da solução 1 e triture por mais 30 segundos. Transfira o conteúdo para um tubo de centrifugação de 15mL, com tampa e incube na geladeira por uma noite. Centrifugue o extrato (3.000 rpm) por 10 minutos. Cuidadosamente decante o sobrenadante em uma cubeta de vidro para medir a absorbância a 665 e 750 nm. O aparelho deve ser zerado com a solução 1 (acetona a 90%).

Cálculo dos resultados:

$$\text{clorofila-a ug/L} = 11,9 (A_{665} - A_{750}) \text{ V/L} \times 1.000/\text{S}$$

A_{665} – Absorbância a 665 nm

A_{750} – Absorbância a 750 nm

V – Volume da acetona no tubo de centrifugação

L – comprimento da abertura de luz do espectrofotômetro em centímetros

S – volume da amostra (100 mL)

Anexo 3. Formulário para anotações de dados de qualidade da água

Formulário de coleta – Projeto Aquasec			
Equipe da coleta:			
Data da Coleta: () Cheia () Seca			
Ponto de Coleta: () Rio Preto-AM () São Francisco-AL/SE () Dourados-MS			
Nome da propriedade:			
Contato da propriedade:			
Dados da água no dia da coleta			
Variáveis da água	Viveiro 1	Viveiro 2	Viveiro n
Transparência			
Oxigênio			
pH			
Temperatura			
Condutividade			
Amônia total			
Amônia tóxica			
Nitrito			
Alcalinidade			
Fósforo total			
BIOMETRIA			
Identificação peixe/dados	Local de coleta	Peso (g)	Comp. Padrão (cm)
1	Viveiro 1		
2			
3			
4			
5			
6	Viveiro 2		
7			
8			
9			
10			
11	Viveiro n		
12			
13			

Procedimentos Analíticos para Avaliação de Doenças de Peixes

14			
15			

Formulário de coleta de água BIMESTRAL– Projeto Aquasec			
Equipe da coleta:			
Data da Coleta: () Cheia () Seca			
Ponto de Coleta: () Rio Preto-AM () São Francisco-AL/SE () Dourados-MS			
Nome da propriedade:			
Contato da propriedade:			
Dados da água no dia da coleta			
Variáveis da água	Viveiro 1	Viveiro 2	Viveiro 3
Transparência			
Oxigênio			
pH			
Temperatura			
Condutividade			
Amônia total			
Amônia tóxica			
Nitrito			
Alcalinidade			
Fósforo total			
Observações:			

Anexo 4. Formulário para anotações de dados de parasitologia

Formulário de parasitologia – Projeto Aquasec				
Equipe da estação:				
Data da Coleta: _____ () Cheia () Seca				
Ponto de Coleta: () Rio Preto-AM () São Francisco-AL/SE () Dourados-MS				
Nome da propriedade:				
Contato da propriedade:				
Dados coletados na estação 4				
Identificação peixe	Bexiga natatória	Estômago	Intestino	Observação
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
n				



Tabuleiros Costeiros

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

