



UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Caracterização Fenotípica e Molecular de Bactérias com
Potencial Patogênico em Pacamã (*Lophiosilurus alexandri*
Steindachner, 1877)

Francisco Gilvan Bezerra dos Santos

Petrolina-Pernambuco
2011

Francisco Gilvan Bezerra dos Santos

Caracterização Fenotípica e Molecular de Bactérias com
Potencial Patogênico em Pacamã (*Lophiosilurus alexandri*
Steindachner, 1877)

Dissertação apresentada ao colegiado
de Zootecnia da Universidade Federal
do Vale do São Francisco, como parte
da obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal, na área de Produção
Animal.

Orientador: Prof^o. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa
Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Gisele Veneroni Gouveia

Petrolina-Pernambuco
2011

Santos, Francisco Gilvan Bezerra dos
S237c Caracterização Fenotípica e Molecular de Bactérias com Potencial
 Patogênico em Pacamã (*Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1877)
 / Francisco Gilvan Bezerra dos Santos. -- Petrolina, PE, 2011.
 70f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal
do Vale do São Francisco, *Campus* de Ciências Agrárias, Petrolina,
PE, 2011.

Orientador: Profº. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa.

Co-orientadora: Profª. Dra. Gisele Veneroni Gouveia.

Bibliografia

1. Piscicultura . 2. Peixes – Doenças. 3. *Aeromonas* spp. e
Pseudomonas spp. I. Título. II. Universidade Federal do Vale do São
Francisco.

CDD 639.3

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Biblioteca
SIBI/UNIVASF

Bibliotecário: Lucídio Lopes de Alencar

Francisco Gilvan Bezerra dos Santos
Caracterização Fenotípica e Molecular de Bactérias com
Potencial Patogênico em Pacamã (*Lophiosilurus alexandri*
Steindachner, 1877)

Dissertação apresentada como parte para a obtenção de título de mestre em Ciência Animal

Petrolina-PE, 27 de abril de 2011

Comissão examinadora

Prof^o. Dr. Mateus MatiuZZi da Costa
Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF

Prof^a. Dr^a. Elizabeth Sampaio de Medeiros
Universidade Federal de Alagoas - UFAL

Dr^a. Josir Laine Aparecida Veschi
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Semi-Árido

Dedico à minha esposa Rafaella F. Gomes
e aos meus filhos Jimmy Gomes Santos e
Valentina Gomes Santos

“A compaixão para com os animais é das mais nobres virtudes da natureza humana”

Charles Robert Darwin

Homenagem: João Januário dos Santos (Pai *in memorian*)

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Natureza por ter me permitido concluir esta difícil tarefa com saúde e coragem.

Ao Professor Mateus Matiuzzi da Costa pela orientação, em especial por ter me recebido de braços abertos no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da UNIVASF.

Dr^a. Gisele Veneroni Gouveia pela co-orientação e ajuda nas PCRs pela valiosa ajuda durante a execução de práticas moleculares para a caracterização das espécies de *Aeromonas* spp.

A minha família por compreender o meu esforço e afastamento durante essa jornada de atividades.

Ao Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da UNIVASF

A Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Semi-Árido

A Universidade do Estado da Bahia – UNEB

A Ceixa pelas palavras de apoio, pelo auxílio na limpeza de materiais e esterilização de placas de Petri.

A Gabi de Brasília pela ajuda com as placas.

A Letícia pela compreensão e palavras de incentivo.

A Direção do Colégio Estadual Rotary Clube de Juazeiro-BA, em nome das

Professoras Jussara e Débora.

A Direção da Escola Estadual Poeta Carlos Drummond de Andrade de Petrolina-PE, em nome do Profº. Paulo Bandeira da Silva.

A Carina, veterinária e estagiária do Laboratório de Microbiologia Animal da UNIVASF.

Aos professores do Programa de Mestrado em Ciência Animal da UNIVASF.

Aos funcionários e técnicos da UNIVASF.

Aos meus alunos do Ensino Básico pela imensurável compreensão e paciência.

A Chirles, Márcia pelo companheirismo durante a longa jornada de atividades no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal.

Aos mestrandos em Ciência Animal da UNIVASF, em especial Nara, Rozzanno, Seldon, Flávio e Jackson Roseno.

Ao Camilo, Francimária, Jarbas e Nayanny pelo companheirismo durante o período de curso da disciplina de apicultura.

Ao Rodolfo de Moraes Peixoto pela contribuição na análise de concordância.

A Marielly pela contribuição na formatação de textos e nas discas de elaboração de “slides”.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	XI
LISTA DE TABELAS.....	XII
LISTA DE FIGURAS	XIII
SUMÁRIO	IX
1 – Resumo Geral	XIV
1.1 – ABSTRACT.....	XVI
2 - Introdução Geral	01
3 - Referencial Teórico	03
3.1. A Piscicultura no Brasil.....	03
3.2. O Cultivo do pacamã (<i>Lophiosilurus alexandri</i>)	03
3.3. Doenças causadas por bactérias em organismos aquáticos	04
3.4. Potencial ictozoonótico	06
3.5. Resistência bacteriana	07
3.6. Formação de biofilmes em <i>Aeromonas</i> spp.	09
4. Artigos Científicos	11
4.1 Microbiota bacteriana com potencial patogênico para pacamã (<i>Lophiosilurus alexandri</i>) e seu perfil de sensibilidade a agentes antimicrobianos	12
RESUMO	12
ABSTRACT	13
INTRODUÇÃO	14
MATERIAL E MÉTODOS	15
RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
CONCLUSÕES.....	23
REFERÊNCIAS	24
4.2 Produção de biofilme em isolados patogênicos de <i>Aeromonas hydrophila</i> obtidas de Pacamã (<i>Lophiosilurus alexandri</i>).	32
RESUMO	32
ABSTRACT.....	33
INTRODUÇÃO	34
MATERIAL E MÉTODOS	35

RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	42
5. CONSIDERAÇÕES GERAIS	45
6. REFERÊNCIAS.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

CODEVASF – Companhia de Desenvolvimento dos Vales do Parnaíba e do São Francisco

DAPI - (4,6-diamino-2-fenilindol-Sigma[®])

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

GOF – Glicose oxidativa/fermentativa

MAR – Múltipla resistência a antibióticos

µg – Micrograma

mL – mililitro

% - Porcentagem

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pb – pares de bases

SIM – Motilidade indol

RN – Redução de nitrato

TSA – “Tryptone Soya Agar”

TSI – “Triple Sugar Iron Agar”

UNIVASF – Universidade Federal do Vale do São Francisco

LISTA DE TABELAS

Microbiota bacteriana com potencial patogênico para pacamã (*Lophiosilurus alexandri*) e seu perfil de sensibilidade aos antimicrobianos

Tabela 1. Bactérias identificadas em pacamãs (*Lophiosilurus alexandri*)17

Tabela 2. Perfil de resistência as famílias de antimicrobianos de isolados de pacamã (*Lophiosilurus alexandri*)21

Produção de biofilme em isolados patogênicos de *Aeromonas hydrophila* obtidas de Pacamã (*Lophiosilurus alexandri*)

Tabela 3. Concordância entre os resultados obtidos nos teste de Violeta genciana - VG e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em isolados de *Aeromonas hydrophila* obtidos em pacamãs (*L. alexandri*)39

Tabela 4. Concordância entre os resultados obtidos nos teste de 4,6-diamino-2-fenilindol-DAPI e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em isolados de *Aeromonas hydrophila* obtidos em pacamãs (*L. alexandri*)39

LISTA DE FIGURAS

1. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de isolados de pacamã (<i>Lophiosilurus alexandri</i>)	19
--	----

1 – RESUMO GERAL

Na atividade aquícola, vários são os fatores que reduzem a viabilidade econômica dos empreendimentos, tais como os relacionados à nutrição ou manejo. Além desses, outro aspecto extremamente negativo ocorre devido a possíveis infecções, principalmente por bactérias, entre estas as pertencentes aos gêneros *Aeromonas* e *Pseudomonas* merecem destaque. O presente trabalho teve como objetivo identificar as principais espécies bacterianas causadoras de infecções em pacamã (*Lophiosilurus alexandri*), determinar seu perfil de sensibilidade em resposta aos agentes antimicrobianos e verificar a habilidade dos isolados de *Aeromonas* spp. na produção de biofilme. A identificação das bactérias foi realizada por testes bioquímicos a partir de cultivo em meios seletivos de 177 isolados. A sensibilidade dos isolados aos agentes antimicrobianos foi determinada pelo método de difusão em discos. Foram avaliadas as seguintes drogas antimicrobianas: ácido nalidíxico, ampicilina, ceftriaxona, enrofloxacina, eritromicina, estreptomicina, lincomicina, neomicina, nitrofurantoína, norfloxacina, sulfazotrim e tetraciclina. A produção de biofilme pelos isolados de *Aeromonas* spp. foi determinada por técnicas fenotípicas, através do teste de Violeta de Genciana e DAPI, bem como por amplificação do gene do flagelo lateral. Nas PCRs foram utilizados iniciadores desenhados especificamente para o presente estudo. As espécies bacterianas identificadas foram *Aeromonas hydrophila* (n = 47), *A. media* (n = 15), *A. salmonicida* (n = 27), *Acinetobacter* spp. (n = 20), *Enterobacter aerogenes* (n = 12), *E. agglomerans* (n = 10), *Klebsiella oxytoca* (n = 9), *K. pneumoniae* (n = 5), *Plesiomonas shigelloides* (n = 6), *Pseudomonas alcaligenes* (n = 14), *Shigella sonnei* (n = 2), *Vibrio metschnikovii* (n = 4) e *V. parahaemolyticus* (n = 6). Com relação ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos, foi observada sensibilidade menor do que 70% para as seguintes drogas: ácido nalidíxico (55%), ampicilina (7%), eritromicina (45%), estreptomicina (49%), lincomicina (3%), neomicina (32%), nitrofurantoína (60%), sulfazotrim (68%) e tetraciclina (59%). A resistência a ampicilina foi esperada, dado o número representativo de isolados pertencentes ao gênero *Aeromonas* spp. No teste para detecção de biofilme os resultados positivos foram obtidos em 48,14%, para a PCR em 100% dos isolados de *Aeromonas* spp. para os testes de Violeta de Genciana e DAPI. Os testes fenotípicos e molecular não apresentaram concordância,

demonstrando a subjetividade dos testes fenotípicos e a provável atuação de outros genes sobre a formação de biofilme em *Aeromonas*.

Palavras-chave: *Aeromonas*, microbiota, sensibilidade a antimicrobiana, biofilme

1.1 - ABSTRACT

In aquaculture, several factors reduce the economic viability, as such nutrition and management. Besides, another negative factor is associated with bacterial infections, especially from *Aeromonas* and *Pseudomonas* genus. The present study had the purpose to identify the major bacterial species that infect pacamãs (*Lophiosilurus alexandri*), to determine its sensitivity in response to antimicrobial drugs, as well as the ability of the *Aeromonas* spp. isolates in the biofilm production. The bacterial identification was performed using the biochemical tests from selective medium. The determination sensitivity pattern was performed by disc diffusion method. We evaluated the following antimicrobial drugs: nalidixic acid, ampicillin, ceftriaxone, enrofloxacin, erythromycin, streptomycin, lincomycin, neomycin, nitrofurantoin, norfloxacin, sulfazothrim and tetracycline. The production of biofilm from the *Aeromonas* spp. isolates was determined by using the phenotypical techniques, such as Gentian Violet and DAPI tests, as well as by using the PCR to detect of lateral flagellum gene. The bacterial species identified were: *Aeromonas hydrophila* (n = 47), *A. media* (n = 15), *A. salmonicida* (n = 27), *Acinetobacter* spp. (n = 20), *Enterobacter aerogenes* (n = 12), *E. agglomerans* (n = 10), *Klebsiella oxytoca* (n = 9), *K. pneumoniae* (n = 5), *Plesiomonas shigelloides* (n = 6), *Pseudomonas alcaligenes* (n = 14), *Shigella sonnei* (n = 2), *Vibrio metschnikovii* (n = 4) e *V. parahaemolyticus* (n = 6). In the antimicrobial sensitivity test, we observe lower sensitivity than 70% to the following drugs: nalidixic acid (55%), ampicillin (7%), erythromycin (45%), streptomycin (49%), lincomycin (3%), neomicyn (32%), nitrofurantoin (60%) , sulfazothrim (68%) and tetracycline (59%). The resistance to ampicillin was expected due to expressive number of *Aeromonas* spp isolates. In the biofilm detection tests positive results were obtained to 48.14% for PCR test and 100% of *Aeromonas* spp. isolates for Gentian Violet and DAPI. The phenotypic and molecular tests show no agreement, stressing the subjectivity of phenotypic tests and the importance of other genes in biofilm formation from *Aeromonas* spp.

Key-words: *Aeromonas*, microbiota, antimicrobial sensitivity, biofilm

2 – INTRODUÇÃO GERAL

A piscicultura ganha cada vez mais destaque e importância tanto no cenário internacional, quanto nacional. No entanto, o cultivo de peixes possui custos com rações, instalações e caso a criação seja intensiva há necessidade de mão de obra com conhecimento técnico.

A espécie pacamã (*Lophiosilurus alexandri*), originária da bacia do São Francisco (MARQUES et al., 2008), representa um dos peixes de maior interesse na piscicultura local. É um animal carnívoro/piscívoro e vive junto aos substratos, sendo por este motivo denominado peixe de fundo. No entanto, sabe-se pouco a respeito do seu nicho ecológico. Logo a importância de estudos sobre esse animal, em especial, para identificar a sua microbiota.

Uma importante fonte de prejuízos decorre devido às infecções, principalmente àquelas ocasionadas por bactérias. Dentre o gênero *Aeromonas* spp., a espécie *Aeromonas hydrophila* é a responsável pela maior mortalidade de peixes, principalmente nos cultivos intensivos e semi-intensivos. As infecções causadas por *Aeromonas* spp. aumentam em situação de estresse ou manejo inadequado, mesmo quando diminui a temperatura da água onde são cultivados os peixes. *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio anguillarum* e *Edwardsiella tarda* são classificadas como oportunistas (BARJA e ESTEVES, 1988). Estudos visando caracterizar a microbiota com potencial ictiopatogênico já foram realizados no Brasil para espécies como *Rhamdia quelen* (SHAMA et al., 2000; COSTA et al., 2008) *Piractus mesopotamicus* e *Oreochromis niloticus* (BELÉM-COSTA et al., 2006), bem como em comunidades de peixes do Rio Congonhas no Paraná (SOUSA e SILVA-SOUZA, 2001).

A resistência aos agentes antimicrobianos é um aspecto preocupante na medicina humana e veterinária. Em aquicultura o uso de antimicrobianos tem sido um ponto de grande discussão em virtude do potencial risco de transmissão da resistência entre bactérias no meio aquático. Assim, as drogas podem ser utilizadas em aquicultura e, porém este uso deve ser realizado com prudência.

A resistência às drogas antimicrobianas muitas vezes está associada com a presença de biofilme. O biofilme ou *slime* é uma importante estrutura de crescimento bacteriano, onde as bactérias se multiplicam em camadas, cobrindo superfícies.

Essas estruturas são associadas com a grande resistência ao meio ambiente desfavorável, bem como às drogas antimicrobianas (KOZLOVA et al., 2008). No biofilme também é favorecida a troca de material genético, uma vez que este contém DNA extracelular na sua composição. Além disto, em se tratando de *Aeromonas* spp., o biofilme tem sido muito útil em estratégias de vacinação viabilizando a imunização de muitos peixes ao mesmo tempo e evitando o estresse (NAYAK et al., 2004).

Com este trabalho espera-se contribuir com o cultivo, caracterização e conservação do pacamã, atualmente uma espécie ameaçada, porém de interesse comercial local, nacional e internacional. O objetivo do presente estudo foi caracterizar a microbiota de pacamã formada por *Aeromonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Plesiomonas shigelloides*, *Pseudomonas* spp. e *Vibrio* spp., determinar sua sensibilidade aos antimicrobianos e determinar a habilidade de isolados de *Aeromonas* spp. na produção de biofilme.

3 - Referencial Teórico

3.1. A Piscicultura no Brasil

A piscicultura ganhou destaque no Brasil no início do século XX quando ocorreu a intensificação da reprodução de peixes em cativeiro e formulação de rações em escala industrial nos Estados Unidos da América (CASTAGNOLLI et. al, 2004). No Brasil, sua importância econômica e social é notável (VALENTI et. al, 2000), pois o país tem uma das maiores diversidades de peixes do Planeta, assim como espécies nativas com potencial para a piscicultura (CASTAGNOLLI, 1992). A produção moderna de peixes está embasada em três pilares: produção lucrativa, preservação do meio ambiente e desenvolvimento social (CASTELLANI e BARRELLA, 2005).

A aquicultura brasileira surgiu por volta de 1930, com Rodolpho Von Ihering, ao ficar maravilhado com as espécies nativas, ao observar nos rios Mogi Guaçu e Piracicaba, nos anos de 1928 e 1929 o fenômeno da piracema. Naquela época, observando a concentração dos peixes junto ao salto do rio Piracicaba e nas corredeiras da Cachoeira de Emas, começou a pensar na domesticação de algumas espécies mais nobres daqueles rios, como a piapara (*Leporinus* sp.), o curimatã, (*Prochilodus lineatus*) e o dourado (*Salminus maxillosus*) Ihering (1929) (Apud CASTAGNOLLI, 2004).

3.2. O Cultivo do pacamã (*L. alexandri*)

Dentre as espécies de água doce, tanto nativas quanto exóticas, o pacamã (*L. alexandri*), cada vez mais desperta a atenção dos criadores de peixes, seja para atender restaurantes locais, ou com a finalidade de atender os criadores de peixes ornamentais (LÓPEZ e SAMPAIO, 2000)

O maior desafio para a produção do pacamã é o seu cultivo em cativeiro. Este seria muito importante para atender a procura local, ou seja, o mercado consumidor de Petrolina, cidades circunvizinhas e, simultaneamente conservar plantéis para garantir e minimizar a retirada de exemplares do seu hábitat natural, bem como fazer o repovoamento da bacia do São Francisco (LUZ e SANTOS, 2008).

No cultivo do pacamã (*L. alexandri*) pode ocorrer perda de larvas, pois há canibalismo (LOPÉZ e SAMPAIO, 2000), que com a elevação da densidade populacional intensifica-se. O pacamã difere de outras espécies como a tilápia, pois formam nuvens para se defender dos seus predadores, isto faz com que as larvas de pacamãs não fiquem isoladas e não desperdicem a energia que pode ser convertida em crescimento (MEURER et al. 2010).

O pacamã é uma espécie nativa da bacia do São Francisco, tem carne saborosa e muito apreciada por não apresentar “espinhos” em forma de “y”, no entanto, é de difícil cultivo. Trata-se de um animal carnívoro e piscívoro, na fase larval não aceita o alimento artificial ofertado pelos criadores de peixes em cativeiros (COSTA-NETO et al., 2002).

A alimentação do pacamã em ambiente natural é exclusivamente de peixes, sendo uma das espécies de peixe carnívoro brasileiro de importância nas cadeias alimentares aquática por controlar a densidade das espécies de peixes herbívoros, ou detritívoros (ALVIM e PERET, 2004). No cultivo de peixes carnívoros a elaboração de dietas é um entrave. Em criação de espécies do São Francisco a ração confeccionada para juvenis de surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*) teve um percentual de 52% de farinha de peixe e de proteína bruta foi de 40% (GONÇALVES e CARNEIRO, 2003; PEDREIRA et al., 2008). A recomendação de proteína da (National Research Council - NRC, 1993) para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é de 30% no mínimo em dietas para juvenis. Uma ração a base de soja poderá substituir parcialmente a proteína de origem animal. Em nutrição de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foi adicionado 42% de farelo de soja (MEURER et al., 2005; MEURER et al., 2008). A alimentação viva pode representar o melhor desempenho no crescimento de alevinos do pacamã (*Lophiosilurus alexandri*), (MEURER et al., 2010) ofertando pós-larvas de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) entre 30% e 60% do peso vivo dos animais encontraram o melhor desempenho para alevinos de pacamã.

3.3. Doenças causadas por bactérias em organismos aquáticos

Quando se trata da atividade aquícola em sistema intensivo o avanço das doenças, em especial as bacterianas são maiores (LEMOS et al., 2006). O gênero

Aeromonas spp. é descrito como o mais patogênico, causando sérios prejuízos nos cultivos de peixes de água doce (NAM e JOH, 2007). Segundo HALLIMAN (1993) as infecções causadas por *Aeromonas* spp. representam perdas econômicas em nível mundial.

São comuns as doenças em peixes provocadas por bactérias com apresentação de lesões externas hemorrágicas e lesões em órgãos internos em especial às ocasionadas por *Aeromonas hydrophila* (ADANIR e TURUTOGLU 2007). *A. hydrophila* possui genes capazes de produzir aerolisina e hemolisina WANG et al. (2003) detectaram esses genes e caracterizaram como sendo capazes de produzir processos citolíticos e hemolíticos em animais de laboratório.

Peixes infectados por *A. hydrophila* possuem uma maior suscetibilidade para outros agentes infecciosos entre estes muitos grupos bacterianos (HIRSCH et al., 2006). KOZIŃSKA et al. (2002) encontraram lesões intensas externa e internamente com ascite na cavidade peritoneal e presença de hemorragia renal e hepática e mortalidade de 100% dos animais em experimento com carpa comum (*Cyprinus carpio*) infectadas por *Aeromonas* spp.

BOIJINK et al. (2001) ao inocular *Plesiomonas shigelloides* em Jundiás (*Rhamdia quelen*) verificaram ao final do estudo, a presença de *A. hydrophila*, *Acinetobacter* spp. *Pseudomonas* spp. Estas bactérias podem atuar como oportunistas e provocar diversas infecções em animais aquáticos sendo responsáveis por enormes prejuízos para os aqüicultores. Em um experimento semelhante BOIJINK e BANDÃO (2001), BOIJINK e BANDÃO (2004) ao inocular *A. hydrophila* na mesma espécie de peixe, observaram após 24 horas 100% de mortalidade dos animais em estudo, caracterizando a *A. hydrophila* como uma espécie de elevada virulência.

Os gêneros *Aeromonas* e *Pseudomonas* classicamente são conhecidos como táxons a agrupar o maior número de espécies denominadas de patógenos oportunistas (SAAVEDRA et al., 2004). Em 2004 e 2005 HEWLETT et al. (2009) observaram uma ligação da mortalidade de peixes de água doce acometidas por patógenos oportunistas, em particular por espécies de bactérias isoladas em ambientes de recreação no Reino Unido.

Em um estudo com águas e peixes retirados do rio Congonhas no Paraná foram isoladas *Aeromonas* spp. e *Pseudomonas* spp (SOUSA e SILVA-SOUZA,

2001). Em animais cultivados em oito tilapiculturas localizadas na região do Alto Grande, Minas Gerais foram isoladas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) *Aeromonas jandaei*, *A. hydrophila*, *A. trota*, *A. caviae*, *A. eucrenophila*, *A. veronii* bt *veronii* e *A. schubertii* (HIRSCH et al., 2006). Em jundiás (*Rhamdia quelen*), (SHAMA et al. 2000) isolaram diversos microrganismos de lesões externas e rins, sendo estes *Plesiomonas shigelloides*, *Aeromonas* spp. e *Flavobacterium* sp. as mais freqüentes.

Durante muito tempo acreditou-se que a *Aeromonas salmonicida* infectava apenas salmões (SCHUBERT, 1987). Mas, estudos recentes demonstraram a contaminação de cerca de cinquenta espécies de peixes infectadas por essa bactéria. Segundo KIRKAN et al. (2003) em um estudo realizado na Turquia detectou-se que a alta resistência dessa espécie aos antibióticos, seguia uma característica mundial.

Além das elevadas densidades de peixes em cativeiro, outro fator que pode aumentar a suscetibilidade dos animais é a diminuição nos valores nutricionais, entre eles a carência vitamínica MARTINS et al. (2008) detectaram que a alta virulência provocada por espécies de *Aeromonas* spp. tinha uma relação com a carência de vitamina C. Peixes sob manejo inadequado podem entrar em estresse, o que pode causar uma queda da imunidade conduzindo a um aumento de doenças. Infecções provocadas principalmente por *A. hydrophila* quando os peixes passaram por tratamentos inadequados já foram detectadas (YOGANANTH et al., 2009).

3.4. Potencial ictiozoonótico

Outro aspecto importante a ser destacado é o potencial patogênico do gênero *Aeromonas* nos seres humanos. Estudos realizados na Líbia (ABDULLAH et al., 2003) identificaram várias espécies de *Aeromonas*, principalmente *Aeromonas veronii* e *A. caviae*. Diferentes infecções são provocadas por *Aeromonas* spp. principalmente as septicemias. Assim, bactérias deste gênero são denominadas patógenos oportunistas de humanos (ABULHAMD, 2009). *Aeromonas hydrophila* é classificada como a espécie de prevalência e virulência para peixes e, tem sido estudada em casos de infecções em humanos. Um trabalho realizado nos Estados Unidos da América revelou que vários casos de diarreia em pacientes estavam relacionados à presença dessa espécie (BORCHARDT et al., 2003). As bactérias de

animais aquáticos podem ter como via de transmissão para humanos alimentos derivados de pescados (COSTA et al., 2008). YAGOUB (2009) verificou que no Japão peixes consumidos *in natura* provocaram por diferentes espécies de bactérias da família Enterobacteriaceae e do gênero *Pseudomonas* spp. Portanto outras bactérias de peixes são responsáveis por infecções em consumidores de pescados, representando uma preocupação com a ictozoonose, que deverá ser estudada e controlada para impedir prejuízos para a saúde e para a economia aquícola.

3.5. Resistência bacteriana

O desenvolvimento de bactérias em ambientes aquáticos pode levar a disseminação de genes de resistência (CABELLO, 2006). MESSI et al. (2005) encontraram resistência a vários antibióticos por *Pseudomonas* spp. Dentro deste gênero há espécies encontradas em ambientes terrestres e aquáticos, como, exemplo *P. aeruginosa*. MAIA et al. (2009) isolaram de pescados e cortes e, de miúdos de frangos e verificaram que essa espécie apresentava elevada resistência aos antibióticos.

MANIATI et al. (2005) em um estudo com *Aeromonas* isoladas de peixes, verificaram que 89% dos isolados mostraram resistência a ampicilina incluindo as espécies *Aeromonas hydrophila* e *A. veronii* bv *sobria* que foram as mais resistentes. Este resultado é interessante devido à resistência natural das *Aeromonas* spp. aos beta-lactâmicos (SAAVEDRA et al., 2004). *Aeromonas* spp. apresentou altos níveis de resistência às drogas em um estudo realizado por HATHA et al. (2005) onde a maior resistência foi para a ampicilina (100%) com as espécies *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria* e *A. caviae*.

O emprego de drogas em larga escala tanto para fins profilático quanto terapêutico tem provocado a seleção de populações bacterianas resistentes aos antibióticos (SARTER et al., 2007). A resistência a diferentes antibióticos foi detectada em peixes marinhos e de água doce, causando preocupação tanto na medicina humana como veterinária, tendo em vista as doenças causadas em humanos e animais domésticos por bactérias multi-resistentes (BLACKBURN et al., 2010).

Na tentativa de curar ou controlar as doenças de peixes, os piscicultores vêm

utilizando drogas não autorizadas legislativamente. Dos antimicrobianos que têm sido usados nos cultivos de peixes a enrofloxacin é utilizada sem permissão.

O emprego de antibióticos é uma poderosa arma contra as infecções bacterianas em humanos e animais aquáticos. Por outro lado, o uso indiscriminado pode provocar toxicidade para o homem e animais (CHYTHANYA et al., 1999). Os alimentos de origem animal é o principal mecanismo de transferência de bactérias resistentes selecionadas durante a criação de animais em cativeiros (LIMA et al., 2006; HOWGATE, 1998). ANDRADE et al. (2010) verificaram que em isolados de outros animais aquáticos a enrofloxacin apresentou-se como uma droga eficaz, sendo *Streptococcus* spp. o gênero mais sensível e *Pseudomonas* spp. o mais resistente. No entanto, o emprego sem critérios da enrofloxacin poderá selecionar cepas de bactérias resistentes e comprometer a saúde de organismos aquáticos e humanos.

A resistência bacteriana aos fármacos é estudada em diferentes países. A identificação de resistência tem preocupado criadores de animais aquáticos, assim como os consumidores de produtos derivados de pescados. LIMA et al. (2006) ao testarem diferentes antibióticos, detectaram resistência principalmente para ampicilina, eritromicina e tetraciclina em bactérias isoladas de filé de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em diferentes ambientes. Talvez uma alternativa fosse o emprego de terapias com extratos de plantas. Um estudo realizado por TURKER et al. (2009) detectou uma diminuição da resistência das principais espécies de bactérias causadoras de doenças em peixes quando foram expostas aos extratos de plantas. Outra alternativa adotada pelos piscicultores tem sido a utilização de vacinas, como alternativa aos antibióticos, porém as aplicações por inoculação não são fáceis. Além de lenta, exigem pessoas treinadas muitas vezes não disponíveis aos criadores de peixes. Existem algumas vacinas em uso contra espécies de patógenos mais virulentos (OSMAN et al., 2009). ABDEL-HADI et al. (2009) aplicaram em um híbrido de *Oreochromis niloticus* x *O. mossambicus* duas vacinas, uma contra a *Aeromonas hydrophila* e a outra contra a *Pseudomonas putida* conseguindo imunizar os animais neste estudo em questão.

Ao analisar água mineral engarrafada MESSI et al. (2005) descobriram que a contaminação por bactérias foi significativa, principalmente por *Pseudomonas* spp. com maior resistência a clorofenicol, seguido pela ampicilina e sulfametazina. Em

um estudo envolvendo plasmídios SENGELOV e SORENSEN (1998) verificaram resistência das espécies *Pseudomonas fluorescens* e *P. putida* para os antibióticos rifamicina e ácido nalidíxico.

3.6. Formação de biofilmes em *Aeromonas* spp.

Biofilmes são estruturas de proteção formadas pelas bactérias com organização de colônias vivas. São compostas por alguns açúcares e outras moléculas biológicas e, principalmente por células bacterianas mortas (TIBA et al., 2009).

A formação de biofilme apresenta um alto nível de organização, onde as bactérias apresentam-se de forma estruturada e coordenada, as comunidades garantem o estabelecimento de um sistema de comunicação que coordena atividades metabólicas para benefício mútuo e também a produção de fatores de virulência para facilitar a instalação no hospedeiro (O'TOOLE et al., 2000).

As bactérias têm capacidade de formar biofilmes por adesão aos meios nos quais são cultivadas. Em estudos realizados por MERINO et al. (2003) foi descoberto um flagelo lateral em *Aeromonas* spp. como fator de virulência pela capacidade de adesão as células eucarióticas e formação de biofilme. Com o emprego de plasmídios foi possível detectar em *Aeromonas salmonicida* a capacidade ou habilidade dessa espécie causar patogenicidade em peixes salmonídeos. Ainda nesse estudo observou-se motilidade similar para *Shigella* spp. quando comparada com a espécie *A. salmonicida*.

Estudando a produção de biofilme em *Aeromonas hydrophila* CANALS et al. (2006) descobriram que a formação do flagelo lateral pela *A. hydrophila* AH-3 estava associada a vários genes. Pelo menos nove genes relacionados à produção de flagelo lateral (*laf A* a *U*) já foram identificados e caracterizados em *A. hydrophila* (GAVÍN et al., 2002).

Biofilmes têm sido usados como um método para imunização de peixes. A vacinação é feita por via oral através de antígenos adicionados na alimentação dos peixes. Pelo método tradicional a resposta imunológica dos animais é baixa, pois ocorre perda dos antígenos na água. Os animais podem responder de forma negativa ao método tradicional de vacinação por causa do estresse durante a

vacinação (NAYAK et al., 2004), enquanto com essa técnica existe redução considerável do estresse. Em um estudo realizado na Índia com “catfish” (*Clarias batrachus*) foi verificado que os peixes que não receberam a vacina (grupo controle) a taxa de sobrevivência foi de 24% a 35%, enquanto que, no grupo vacinado com células livres a sobrevivência foi de 46% a 56% e no grupo onde foi utilizado o biofilme a sobrevivência foi de 93% a 100%. Assim, o uso de biofilme como uma medida preventiva poderá ser utilizada no controle de doenças provocadas por bactérias (NAYAK et al., 2004).

KIROV et al. (2004), estudando *Aeromonas hydrophila*, identificaram uma grande adesão dessa espécie à diferentes tipos de células com a formação de biofilme. Nesse mesmo estudo foi verificada a formação de flagelo polar, porém com uma frequência inferior aos valores observados para o flagelo lateral. A adesão de ambos os flagelos foi detectada em células epiteliais do intestino humano.

A formação de biofilme pode oferecer a bactéria condições de se desenvolver em diferentes nichos, por exemplo, infectar peixes, anfíbios, répteis, moluscos e humanos. Nesses diferentes hospedeiros, por exemplo, a *Aeromonas hydrophila* pode sofrer mutações e conseqüentemente aumentar sua virulência KOZLOVA et al. (2008) observaram que *A. hydrophila* formou biofilme “in vitro” e desenvolveu mutação tornando-se mais virulentas.

A formação e presença de biofilme podem ser avaliadas por diversos métodos, que podem ser de cunho fenotípico baseado em coloração como a violeta de genciana e de fluorescência emitida pelo DAPI e, existem também os métodos baseados em DNA como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), técnica que permite a amplificação com posterior visualização de genes específicos relacionados produção de biofilme. A PCR é o método de estudo mais confiável por não ser subjetivo.

4. Artigos Científicos

Artigo 4.1

Microbiota bacteriana com potencial patogênico para pacamã (*Lophiosilurus alexandri*) e seu perfil de sensibilidade a agentes antimicrobianos

Francisco Gilvan Bezerra dos Santos, Gisele Veneroni Gouveia, Mateus Matiuuzzi da Costa

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi identificar fenotipicamente bactérias com potencial patogênico para pacamã (*Lophiosilurus alexandri*). Amostras de brânquias (n=92), rins (n=65), lesões externas (n=9) e ovas (n=11) foram semeadas em ágar TSA. A identificação das bactérias foi realizada utilizando o perfil bioquímico, sendo o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos determinado pelo método de difusão em disco. Através dos testes bioquímicos as espécies identificadas foram *Aeromonas hydrophila* (n = 47/177), *A. salmonicida* (n = 27/177), *Acinetobacter* spp. (n = 20/177), *A. media* (n = 15/177), *Pseudomonas alcaligenes* (n = 14/177), *Enterobacter aerogenes* (n = 13/177), *Klebsiella oxytoca* (n = 9/177), *E. agglomerans* (n = 9/177), *Plesiomonas shigelloides* (n = 6/177), *Vibrio parahaemolyticus* (n = 6/177), *K. pneumoniae* (n = 5/177), *Vibrio metschnikovii* (n = 4/177) e *Shigella sonnei* (n = 2/177). Com relação ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foram caracterizados de: 85%/177 norfloxacin, 79%/177 ceftriaxona, 78%/177 enrofloxacin, 68%/177 sulfazotrim, 60%/177 nitrofurantoína, 59%/177 tetraciclina, 55%/177 ácido nalidíxico, estreptomicina 49%/177, eritromicina 45%/177, neomicina 32%/177, ampicilina 7%/177 e lincomicina 3%/177. A resistência múltipla foi observada para todos os grupos testados. Tendo em vista a ocorrência de bactérias com potencial patogênico para pacamã e sua elevada resistência as drogas, deve-se usar de grande critério quando da implementação de antimicrobianoterapia. Desta forma pode-se garantir a segurança da saúde humana e animal, bem como proteger o meio ambiente.

Palavras-chave: *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp. sensibilidade antimicrobiana, microbiota

ARTICLE 1

Bacterial microbiota with pathogenic potential to pacamã (*Lophiosilurus alexandri*)
and its sensitivity pattern to antimicrobial drugs

Francisco Gilvan Bezerra dos Santos, Gisele Veneroni Gouveia, Mateus Matiuzzi da Costa

ABSTRACT

The purpose of this study was to identify by phenotypic test bacteria with pathogenic potential to pacamã (*Lophiosilurus alexandri*). Samples from gills (n=92), kidneys (n=65), external lesions (n=9) and eggs (n=11) were streaked in TSA agar. The bacterial identification was performed by using the biochemical tests and the sensitivity pattern by using the disc diffusion test. The bacterial species identified through biochemical analysis were *Aeromonas hydrophila* (n = 47/177), *A. salmonicida* (n = 27/177), *Acinetobacter* spp. (n = 20/177), *A. media* (n = 15/177), *Pseudomonas alcaligenes* (n = 14/177), *Enterobacter aerogenes* (n = 13/177), *Klebsiella oxytoca* (n = 9/177), *E. agglomerans* (n = 9/177), *Plesiomonas shigelloides* (n = 6/177), *Vibrio parahaemolyticus* (n = 6/177), *K. pneumoniae* (n = 5/177), *Vibrio metschnikovii* (n = 4/177) e *Shigella sonnei* (n = 2/177). The percentage of sensitivity to antimicrobial drugs was 85%/177 to norfloxacin, 79%/177 to ceftriaxone, 78%/177 to enrofloxacin, 68%/177 to sulfazothrim, 60%/177 to nitrofurantoin 59%/177 to tetracycline, 55%/177 to nalidixic acid, 49%/177 to streptomycin, 45%/177 to erythromycin, 32%/177 to neomycin, 7%/177 to ampicillin and 3%/177 to lincomycin. Multiple resistances were observed to all analyzed isolates. Considering the occurrence of pathogenic bacteria and its resistance to antimicrobial drugs, safety may be adopted during antimicrobial therapy. So we can guarantee the protection of human and animal health, as well as the environment.

Key-words: *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp., antimicrobial sensitivity, microbiota

INTRODUÇÃO

A piscicultura vem conquistando cada vez mais destaque e importância tanto no cenário nacional quanto internacional (CASTAGNOLLI et al., 2004). No entanto, gastos com o cultivo de peixes, custos excessivos com rações, instalações e necessidade de mão de obra com conhecimento técnico são necessários. Outro empecilho ocorre devido às infecções, principalmente àquelas ocasionadas por bactérias (COSTA et al., 2008).

A espécie pacamã (*Lophiosilurus alexandri*), originária da bacia do São Francisco, representa um dos peixes de maior interesse na piscicultura brasileira em especial no Sub-Médio do Rio São Francisco (LÓPEZ e SAMPAIO, 2000).

Os ambientes aquáticos são os mais expostos à presença de patógenos, por se tratarem de locais visitados pelas mais diferentes espécies de animais e ainda por contarem com a possibilidade de transporte de muitos agentes etiológicos deixados no solo e levados durante as estações chuvosas. Conseqüentemente animais aquáticos, em especial peixes representam a maior exposição aos microrganismos (BOIJINK et al., 2001).

A presença de organismos contagiosos em seu habitat pode fazer com que os peixes apresentem uma microbiota variada. Todavia com as alterações ambientais e/ou comportamentais, como por exemplo, criação intensiva com elevada densidade de animais por metro cúbico, queda de valores nutricionais dos alimentos, manejo inadequado conduzindo os animais ao estresse, mudanças bruscas da temperatura, excesso de resíduos metabólicos, podem interferir na imunidade dos peixes, provocando quadros de infecções causadas por bactérias oportunistas (LIMA et al., 2006).

Alta densidade animal caracteriza-se como um fator predisponente às infecções bacterianas, dentre elas, as causadas por *Aeromonas* spp., bactérias que têm causado enormes prejuízos para os criadores de peixes pelas infecções provocadas, principalmente por *Aeromonas hydrophila* (ABULHAMD, 2009). Esse gênero tem apresentando alta resistência às drogas mais usadas na piscicultura (BELÉM-COSTA e CYRINO, 2006; SARTER et al., 2007). O uso freqüente e indiscriminado de agentes terapêuticos tem contribuído de forma relevante para o surgimento da resistência à oxitetraciclina, amoxicilina, ampicilina, novobiocim e polimixin-B (SAAVEDRA et al., 2004; HATHA, 2005).

As *Aeromonas* podem conduzir à diarreia, gastroenterites, septicemias infecciosas ou infecções tais como endocardites, meningites e pneumonia (BALCÁZAR et al., 2007). São capazes de produzir uma variedade de enzimas, por exemplo, elastase, amilase, nuclease, lipase, protease, gelatinase e lecitinase, que constituem importantes fatores de virulência associados a enfermidades em peixes e humanos (OROZOVA et al., 2008; KOZIŃSKA e PEKALA, 2010). Este estudo teve como objetivo identificar a microbiota do pacamã (*Lophiosilurus alexandri*) e, verificar o seu perfil de sensibilidade às drogas antimicrobianas.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da Universidade Federal do Vale do São Francisco do Colegiado de Zootecnia no *Campus* de Ciências Agrárias. O período de isolamento ocorreu entre dezembro de 2009 e fevereiro de 2010. Foram utilizados 100 juvenis de pacamã (*Lophiosilurus alexandri*), doentes, que vieram a óbito nas instalações de reprodução da Companhia de Desenvolvimento dos Vales do Parnaíba e do São Francisco - CODEVASF. Ovas (de quinze desovas) também foram utilizadas no estudo. Os animais foram criados em tanques com água vinda diretamente do sistema de abastecimento. Não havia tratamento, aeração ou a recirculação de água de forma que ocorresse influência nos resultados da pesquisa.

Isolamento e identificação

As amostras retiradas de brânquias, rins, lesões e ovas foram semeadas em meio de cultura TSA (Tryptone Soya Agar) e incubadas a 27°C por 24 horas. A identificação da microbiota bacteriana foi realizada por características morfológicas, bioquímicas e tintoriais conforme descrito por QUINN et al. (1994) e HOLT et al. (1994). Foram utilizadas a coloração de Gram e os testes bioquímicos, tais como a produção de oxidase, o padrão fermentativo e a produção de gás e H₂S no TSI (Triple Sugar Iron Agar), oxidação-fermentação da glicose em GOF, perfil bioquímico no meio SIM, fermentação da sacarose, redução de nitrato, vermelho de metila, produção da esculetina, hidrólise da gelatina e descarboxilação da ornitina.

Teste de sensibilidade

O teste de sensibilidade foi realizado pelo método modificado de difusão em disco Kirby-Bauer (BAUER et al., 1966 e CLSI 2007) com turvação microbiana na escala 0,5 de Mac Farland em caldo Müeller Hinton. As amostras foram transferidas com auxílio de *swab* estéril para placas contendo ágar Müeller Hinton, nesta aplicaram-se discos contendo as seguintes drogas aminoglicosídeos: estreptomicina (10µg), lincomicina (02µg), neomicina (30µg); betalactâmicos: ampicilina (10µg), ceftriaxona (30µg); macrolídeos: eritromicina (10µg); nitrofurantoína: nitrofurantoína (30µg); quinolonas: ácido nalidíxico (30µg), enrofloxacina (05µg), norfloxacina (10µg); tetraciclina: tetraciclina (30µg) e sulfazotrim (25µg). As placas foram incubadas em estufa a 27°C durante 24 horas. O índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA) foi calculado de acordo com descrições proposta por KRUPERMAN (1983).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O isolamento bacteriano foi possível a partir das amostras de brânquias: (n=92/177), rins (n=65/177), ovas (n=11/177) e lesões externas (n=9/177), dos animais enfermos que vieram a óbito. O maior isolamento de bactérias das brânquias dos pacamãs indica a grande distribuição ambiental dos microrganismos no ambiente aquático e na superfície dos peixes. Os rins são considerados importantes órgãos de clearance bacteriano em peixes e geralmente são utilizados para indicar infecção (GUZMAN e SHOTTS, 1988; AUSTIN e AUSTIN, 1999). Em um experimento realizado no Sul do Brasil SHAMA et al. (2000) isolaram com a maior frequência microrganismos nos rins, do que de lesões externas em jundiás (*Rhamdia quelen*).

As espécies de bactérias identificadas fenotipicamente podem ser observadas na (**Tabela 1**), destacando a presença dos seguintes microrganismos: *Aeromonas hydrophila* (n = 47/177), *A. salmonicida* (n = 27/177), *Acinetobacter* spp. (n = 20/177), *A. media* (n = 15/177), *Pseudomonas alcaligenes* (n = 14/177), *Enterobacter aerogenes* (n = 13/177), *Klebsiella oxytoca* (n = 9/177), *E. agglomerans*

(n = 9/177), *Plesiomonas shigelloides* (n = 6/177), *Vibrio parahaemolyticus* (n = 6/177), *K. pneumoniae* (n = 5/177), *Vibrio metschnikovii* (n = 4/177) e *Shigella sonnei* (n = 2/177).

Neste estudo prevaleceram bactérias pertencentes às famílias Aeromonadaceae e Enterobacteriaceae. Deste grupo há um grande número de espécies consideradas como povoadoras de reservatórios aquáticos. Em um experimento realizado por CARNEIRO et al. (2007), com tilápia do Nilo doentes foram isoladas 25% das amostras pertencentes as famílias Aeromonadaceae e Enterobacteriaceae. No presente estudo os resultados corroboram os da literatura e demonstram o potencial patogênico das bactérias isoladas do pacamã (*L. alexandri*). As enterobactérias são descritas como tendo potencial patogênico oportunista em peixes, a despeito de sua ampla disseminação no ambiente aquático (NEWAJ-FYZUL et al., 2008). Exceção deve ser feita a certos grupos específicos, tais como *P. shigelloides*, *Edwardsiella tarda* e *Yersinia ruckeri* (SHAMA et al., 2000). Neste estudo este fato pode ser justificado devido à maior parte das enterobactérias (52%) terem sido isolados das brânquias.

Tabela 1. Bactérias identificadas em pacamãs (*Lophiosilurus alexandri*)

Espécie-Gênero	Local do Isolamento				Total	%
	Brânquia	Rim	Lesão	Ovas		
<i>Aeromonas hydrophila</i>	28	15	4		47	26,55
<i>Aeromonas salmonicida</i>	17	10			27	15,25
<i>Aeromonas media</i>	9	6			15	8,47
<i>Acinetobacter</i> spp.	8	6		6	20	11,3
<i>Enterobacter</i> spp.	7	10	2	3	22	12,43
<i>Klebsiella</i> spp.	6	7		1	14	7,9
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	5	1			6	3,4
<i>Pseudomonas</i> spp.	5	5	3	1	14	7,9
<i>Shigella</i> spp.	2				2	1,13
<i>Vibrio</i> spp.	5	5			10	5,65

Das bactérias identificadas 50,27% pertenciam ao gênero *Aeromonas* e desse gênero 52,80% a espécie *Aeromonas hydrophila*, concordando com estudos realizados por outros pesquisadores que encontraram frequências semelhantes (HIRSCH et al., 2006; NAM e JOH, 2007; LIMA et al., 2006 JACOBS et al., 2007; JACOBS e CHENIA, 2007 e SILVA et al., 2010). A espécie *Aeromonas hydrophila* é a mais comum do gênero *Aeromonas* (CIPRIANO, 2001; MIRANDA e ZEMELMAN 2002). No trabalho desenvolvido por SHAMA et al. (2000), *Aeromonas* spp. foi isolada em 6% das amostras de rins e de lesões externas de jundiás, sendo que no mesmo estudo os isolados mais prevalentes foram de *Plesiomonas shigelloides*. Embora, a maioria das bactérias isoladas no presente estudo pertença ao gênero *Aeromonas*, variações na prevalência das espécies podem ser observadas em diferentes estudos e isto pode ser explicado por diferenças no meio ambiente de criação dos peixes. As *Aeromonas* são capazes de produzir várias enzimas, por exemplo, elastase, amilase, nuclease, lipase, protease, gelatinase e lecitinase, essas enzimas são denominadas como fatores de virulência e causam doenças em peixes e humanos (SEN e RODGERS, 2004; OROZOVA et al., 2008 e KOZIŃSKA e PEKALA, 2010). Cepas de *Aeromonas* são capazes de produzir mecanismos de virulência e tornarem-se invasivas e destruir diferentes tipos de tecidos de peixes, como, por exemplo, cepas de *Aeromonas salmonicida* (MAILAFIA e NOK, 2009; JUTFELT et al., 2008; ABEROUM e JOOYANDEH, 2010).

Aeromonas são bactérias capazes de infectar tanto animais ectotérmicos quanto animais endotérmicos, logo são parasitas de animais de sangue frio e de sangue quente, que podem causar doenças também em humanos (ABEROUM e JOOYANDEH, 2010). Diversos estudos mostram a participação destas bactérias em diarreias, gastroenterites, septicemias, endocardites e meningites em pacientes humanos (GUERRA et al., 2007; PEREIRA et al., 2008; MOLINARI et al., 2003).

O número de isolados de *Pseudomonas* spp. não foi tão expressivo, em relação ao descrito na literatura (NEWAJ-FYZUL et al., 2008). Entretanto estas bactérias são importantes patógenos de organismos aquáticos e merecem atenção, particularmente pela crescente resistência a agentes antimicrobianos (OBRITSCH et al., 2004). Além disso, essa bactéria pode ser associada a intoxicações alimentares particularmente após o consumo de carne de peixe crua, o que foi descrito no Japão (YAGOUB, 2009).

Neste estudo a porcentagem de *Vibrio* spp. isolados foi baixa, este resultado pode ser explicado pela dificuldade no isolamento e cultivo de espécies desse gênero (BALCÁZAR et al., 2010). AKINBOWALE et al. (2006) ao avaliar peixes e crustáceos descreveram o predomínio de bactérias dos gêneros *Vibrio* spp. e *Aeromonas* spp.. Espécies do gênero *Vibrio* spp. são capazes de causar doenças em humanos, que podem ser encontradas em alimentos, e principalmente na água, também podendo ser isolados de organismos marinhos (WARD e BEJ, 2006). Na Turquia foram isoladas cepas de *Vibrio* infectando peixes, que são capazes de provocar danos para a saúde dos animais em criadouros (DEMIRCAN e CANDAN, 2006). PEREIRA et al. (2007) isolaram *Vibrio* de mexilhões (*Perna perna*) e verificaram que cerca de 11% das amostras foram de *Vibrio parahaemolyticus*.

A presença de *Plesiomonas shigelloides* foi observada em apenas 3% do total de amostras isoladas neste estudo, mas em experimentos realizados em outros ambientes com condições distintas este microrganismo foi isolado em 12% (ESPOSTO et al., 2007). O potencial patogênico de *P. shigelloides* foi descrito em vários estudos (BOIJINK et al., 2001; TSUGAWA et al., 2007).

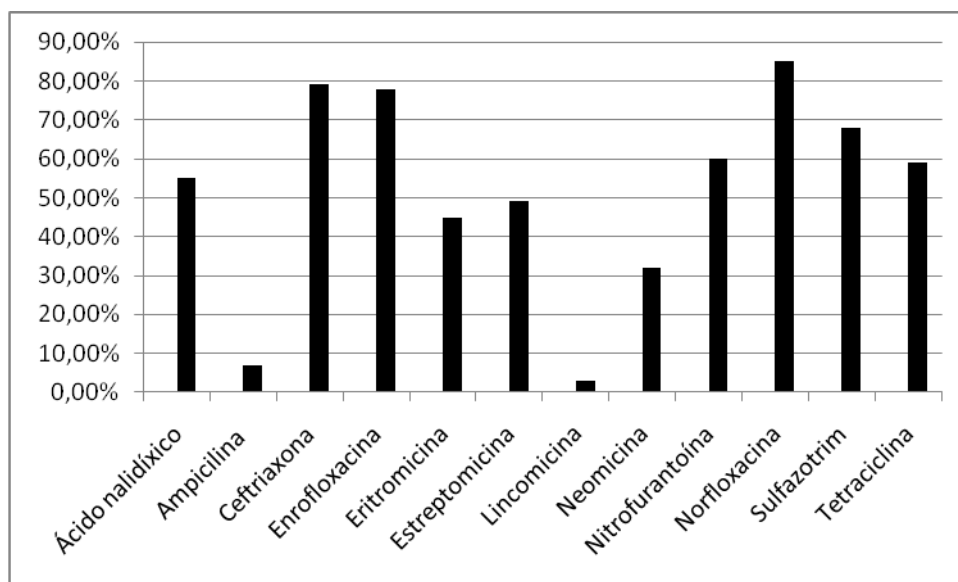


Figura 1. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de isolados de pacamã (*Lophiosilurus alexandri*)

O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos pode ser observado na **Figura 1**. Alta sensibilidade foi observada para norfloxacina e enrofloxacina, duas quinolonas. Os resultados foram semelhantes aos obtidos por outros pesquisadores (SOUSA e SILVA-SOUZA, 2001; HATHA et al., 2005; AKINBOALE et al., 2006; COSTA et al.,

2008). Contudo diferem dos relatados por AIRAS et al. (2010), embora estes autores tenham trabalhado com amostras de *Aeromonas* spp. selecionadas de diarreia em humanos. Em peixes GIRAUD et al. (2004) e SMITH et al. (2010), afirmam que as quinolonas são drogas de grande utilização no combate a furunculose e outras infecções ocasionadas por *Aeromonas* spp.

Neste estudo a sensibilidade à tetraciclina e ao sulfazotrim foi considerada moderada (**Tabela 1**). Estas drogas possuem grande potencial de uso na aquicultura, sendo recomendadas para o tratamento de diversas infecções em peixe, tais como as vibrioses e a furunculose (SMITH et al., 2010). A ocorrência de *Aeromonas hydrophila* resistente à tetraciclina foi descrita em uma pesquisa feita com carpa (*Misgurnus anguillicaudatus*) na Coreia (JUN et al., 2010) e no Brasil (CARNEIRO et al., 2007). Da mesma forma, a sensibilidade aos aminoglicosídeos também foi considerada moderada para a mesma espécie, contudo drogas deste grupo possuem pouco uso em aquicultura (JUN et al., 2010).

Com relação aos beta-lactâmicos, alta sensibilidade foi observada à ceftriaxona (79%), enquanto que baixa sensibilidade foi obtida frente à ampicilina (7%) e lincomicina (3%). A resistência aos beta-lactâmicos é crescente em isolados de peixes (SAAVEDRA et al., 2004; COSTA et al., 2008; FRANCO et al., 2010). Caso particular se faz em relação à ampicilina, cuja resistência é descrita como intrínseca para isolados de *Aeromonas* spp. (SAAVEDRA et al., 2004). A baixa sensibilidade das bactérias avaliadas a ampicilina pode estar associada à alta frequência de bactérias do gênero *Aeromonas*. Nestas bactérias a resistência aos beta-lactâmicos está associada à produção de enzimas beta-lactamases (IACONIS e SANDERS, 1990). Em estudo de FRANCO et al. (2010), avaliando isolados de camarões (*Litopenaeus vannamei*) encontraram resistência à ampicilina e lincomicina próximo da resistência observada neste estudo. COSTA et al. (2008) detectaram elevado nível de resistência à ampicilina para bactérias isoladas de jundiás (*Rhamdia quelen*) cultivados em Santa Maria-RS, Brasil. *Vibrio* spp. resistente a ampicilina em isolados de robalos (*Dicentrarchus labrax*) cultivados na piscicultura da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal em uma pesquisa realizada por SAAVEDRA et al. (2004).

Quando verificada a resistência múltipla aos antimicrobianos de acordo com o grupo de bactérias analisadas (**Tabela 2**) observa-se que este foi maior para as

enterobactérias, seguido dos vibrios. Um aspecto importante a ser destacado é que todos os grupos de bactérias obtidas de pacamãs apresentaram resistência a mais de dois grupos de drogas antimicrobianas simultaneamente. Quando analisados em conjunto estes dados trazem grande preocupação, uma vez que estas bactérias possuem uma ampla distribuição ambiental. A troca de genes de resistência entre bactérias ambientais e patógenos oportunistas é algo bem estudado especialmente no ambiente aquático (SENGELOV e SORENSEN, 1998). SILVA (2011), analisando a sensibilidade de *A. hydrophila* obtidas de peixes do Rio São Francisco observaram também resistência múltipla aos antimicrobianos, sendo que esta poderia estar relacionada à contaminação ambiental por antibióticos e metais pesados infectando o pacamã (*Lophiosilurus alexandri*). Níveis de resistência aos antimicrobianos também foram relatados em outros trechos do Rio São Francisco em outros estudos (LEMOS et al., 2006).

Tabela 2. Perfil de resistência as famílias de antimicrobianos de isolados de pacamã (*Lophiosilurus alexandri*)

Gênero	N	AM	CR	TE	ES	LI	NE	ER	SU	EM	NA	NO	NI	IRMA
<i>Aeromonas</i>	89	77	13	44	44	89	57	55	36	24	38	77	41	0,58
<i>Acinetobacter</i>	20	40	50	50	65	50	95	60	35	40	75	40	40	0,59
<i>Enterobacter</i>	22	95	62	38	81	100	86	71	43	38	71	24	33	0,61
<i>Klebsiella</i>	14	83	17	42	42	92	42	83	17	0	33	8	83	0,64
<i>P. shigelloides</i>	6	100	0	50	50	100	50	83	50	33	83	0	50	0,52
<i>Pseudomonas</i>	14	100	21	50	77	77	64	21	21	0	7	14	7	0,57
<i>Shigella</i>	2	100	0	50	100	100	50	100	0	50	50	0	50	0,63
<i>Vibrio</i>	10	100	33	33	78	89	67	67	78	44	33	22	22	0,64

onde: n= número de amostras; AM: Ampicilina; CR: Ceftriaxona; TE: Tetraciclina; ES: Estreptomicina; LI: Lincomicina; NE: Neomicina; ER: Eritromicina; SU: Sulfazotrim; EN: Enrofloxacina; NA: Ácido Nalidíxico, NO: Norfloxacina; NI: Nitrofurantoina; IRMA: Índice de Resistência Múltipla aos Antimicrobianos.

Embora a resistência múltipla nos isolados de *Aeromonas* spp. não tenha apresentado os maiores índices de resistência nesta pesquisa, diversos outros estudos têm alertado para preocupação com relação a este fato. Em *Aeromonas* isoladas de água potável, pacientes e criatório de peixes demonstraram resistência múltipla (OROZOVA et al., 2008; ZAKY et al. , 2010). Em uma pesquisa realizada na Índia verificou-se resistência múltipla de *Aeromonas hydrophila* isoladas de peixes para todos os grupos de fármacos testados (KASKHEDIKAR e CHHABRA, 2010).

O uso não planejado de antibióticos nos cultivos de peixes tanto como prevenção quanto para terapêutica vem aumentando a resistência de bactérias pelo processo de seleção. Assim como outras atividades humanas não planejadas (CAUMO et al., 2010). Segundo SARTER et al. (2007), a Ásia passou a apresentar

bactérias com múltipla resistência aos antibióticos provocados pelo uso sem controle de diferentes fármacos.

Os peixes utilizados no presente estudo foram oriundos de uma propriedade sem histórico de uso de drogas antimicrobianas, próximo a cidade de Petrolina, onde todo o esgoto doméstico e industrial é lançado no rio sem tratamento prévio e, a água que abastece toda a Estação de Piscicultura do Bebedouro é captada cinquenta quilômetros abaixo desta cidade e, não é submetida a tratamentos antes de ser destinada aos tanques de cultivos dos pacamãs. O ambiente aquático é muito dinâmico, o que facilita a transferência de fatores de resistência e emergência de cepas resistentes que podem facilmente chegar aos seres humanos (CABELLO, 2006; NEWAJ-FYZUL et al., 2008).

Dessa forma, o isolamento e identificação das bactérias *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida*, *Acinetobacter* spp., *A. media*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*, *E. agglomerans*, *Plesiomonas shigelloides*, *V. parahaemolyticus*, *K. pneumoniae*, *Vibrio metschnikovii* e *Shigella sonnei* com potencial patogênico para organismos aquáticos, mostram-se como um importante aspecto econômico e ecológico a ser estudado.

CONCLUSÕES

No presente estudo foi verificada a grande variedade de espécies bacterianas com potencial patogênico na microbiota do pacamã (*Lophiosilurus alexandri*), tais como a *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio* spp., *Pseudomonas alcaligenes*, *Plesiomonas shigelloides*, *Acinetobacter* spp. e *Enterobacter* spp.

A multi-resistência a dois ou mais fármacos observada na maioria dos isolados representa uma preocupação a respeito da atividade aquícola desenvolvida no Sub-Médio do Rio São Francisco, bem como a saúde humana dada a possibilidade de infecções humanas por bactérias resistentes.

REFERÊNCIAS

- ABEROUM, A., JOOYANDEH, H. **A Review on Occurrence and Characterization of the *Aeromonas* Species from Marine Fishes**. World Journal of Fish and Marine Sciences 2 (6): 519-523, 2010
- ABULHAMD, A. T., **Characterization of *Aeromonas hydrophila* Isolated from Aquatic Environments Using Phenotypic and Genotyping Methods**, Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 5(6): 923-931, 2009
- AKINBOWALE, O. L., PENG, H. e BARTON, M. D. **Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia**. Journal of Applied Microbiology **100** (2006) 1103-1113
- ARIAS, A., SERAL, C., JOSÉ GUDE, M., CASTILLO, F. J. **Molecular mechanisms of quinolone resistance and *Aeromonas veronii* bv. sobria**. International Microbiology (2010) 13:135-141
- AUSTIN, B. e AUSTIN, D. A., **Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish**. 3rd (revised) edition. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1999.
- BALCÁZAR, J. L., VENDRELL, D., BLAS, I., RUIZ-ZARZUELA, I., GIRONE, O., MÚZQUIZ, J. L. **Quantitative detection of *Aeromonas salmonicida* in fish tissue by real-time PCR using self-quenched, fluorogenic primers**. Journal of Medical Microbiology (2007), 56, 323–328
- BAUER, A. W., KIRBY, W. M. M., SHERRIS, J. C. TURCK, M. **Antibiotic susceptibility testins by a standardized single disk method**. American Journal of Clinical Pathology, v.45, n. 4, p.493-496, 1966
- BELÉM-COSTA, A.; CYRINO, J. E. P. **Antibiotic Resistance of *Aeromonas hydrophila* Isolated from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) AND *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)** Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.),v.63, n.3,

p.281-284, May/June 2006

BOIJINK, C. L., BRANDÃO, D. A., VARGAS, A. C., COSTA, M. M., RENOSTO, A. V. **inoculação de suspensão bacteriana de *Plesiomonas shigelloides* em jundiás, *Rhamdia quelen* (Teleostei: pimelodidae)**, Ciência Rural, Santa Maria, v.31, n.3, p.497-501, 2001

CABELLO, F. C. **Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture a growing problem for human and animal health and for the environment.** Environmental Microbiology (2006) 8 (7), 1137–1144

CARNEIRO, D. O., FIGUEIREDO, H. C. P., PEREIRA JÚNIOR, D. J., LED, C. A. G., LOGATO, P. V. R. **Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas em diferentes sistemas de cultivo de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*)**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.59, n.4, p.869-876, 2007

CASTAGNOLLI, N. **Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva** / editado por José Eurico Possebon Cyrino...[et. al.]. Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática - Divisão de Biblioteca e Documentação – ESALQ/USP – São Paulo : TecArt, 2004.

CAUMO, K., DUARTE, M., CARNGNIN, S. T., RIBEIRO, V. B., TASCA, T., MACEDO, A. J. **Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar.** Revista Liberato, Novo Hamburgo, v. 11, n. 16, p. 89-188, julho a dezembro 2010

CIPRIANO, R. C. ***Aeromonas hydrophila* and Motile Aeromonad Septicemias Of Fish**, Revision of Fish Disease Leaflet 68 (2001) U. S. Geological Survey, Leetown Science Center, National Fish Health Research Laboratory 11700 Leetown Road, Kearneysville, West Virginia 25430

Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI 2007, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, CLSI/ NCCLS, M100-S16, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

COSTA, M. M., PEIXOTO, R. M., BOIJINK, C. L., CASTAGNA, L., MEURER, F., VARGAS, A. C. **Sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de Jundiá (*Rhamdia quelen*)**. Pesquisa Veterinária Brasileira 28(10):477-480, outubro 2008

DEMIRCAN, D., e CANDAN, A. **Identification of *Vibrio anguillarum* by PCR (rpoN Gene) Associated with Vibriosis in Marine Fish in Turkey**. Turkey Juornal Veterinary Animal Sciecen 30 (2006) 305-310

ESPOSTO, E. M., SILVA, W. C. P., REIS, C. M. F., REIS, E. M. F., RIBEIRO, R. V., RODRIGUES, D. P., LÁZARO, N. **Enteropatógenos bacterianos em peixes criados em uma estação de reciclagem de nutrientes e no ecossistema relacionado**. Pesquisa Veterinária Brasileira 27(4):144-148, abril 2007

FRANCO, I., BAGALDO, A. R., GIL, L., OLIVEIRA, D. A. G., ALBINATI, R. C. B., COSTA, M. M. **Caracterização molecular e susceptibilidade aos antimicrobianos de isolados bacterianos de camarões (*Litopenaeus vannamei*)**, Revista Brasileira de Saúde Prod. An., v.11, n.2, p. 527-536 abril a junho, 2010

GIRAUD, E., BLANC, G., BOUJU-ALBERT, A., WEILL, F-X., DONNAY-MORENO, C. **Mechanisms of quinolone resistance and clonal relationship among *Aeromonas salmonicida* strains isolated from reared fish with furunculosis**. Journal of Microbiology (2004), 53, 895-901.

GUERRA, I. M. F., FADANELLI, R., FIGUEIRÓ, M., SCHREINER, F., DELAMARE, A. P. L., WOLLHEIM, C., COSTA, S. O. P., ECHEVERRIGARAY, S. ***Aeromonas* associated diarrhoeal disease in south Brazil: prevalence, virulence factors and antimicrobial resistance**. Brazilian Journal of Microbiology (2007) 38:638-643

GUZMAN, E. D. e SHOTTS, E.B. : **Bacterial culture and evaluation of diseases of fish**. Veterinary Clinical North Am (Small Anim Pract) 18(2): 365-374, 1988

HATHA, M., VIVEKANANDHAN, A. A., JOICE, G. J., CHRISTOL **Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish**, International Journal of Food Microbiology 98 (2005) 131 – 134

HIRSCH, D., PEREIRA JR. D. J., LOGATO, P. V. R., PICCOLI, R. H., FIGUEIREDO, H. C. P. **identificação e resistência a antimicrobianos de espécies de *Aeromonas* móveis isoladas de peixes e ambientes aquáticos**, Ciência agrotécnica, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1211-1217, novembro e dezembro, 2006

HOLT, J. G., KRIEG, N. R., SNEATH, P. H. A., STALEY, J. T., WILLIAMS, S. T. **Bergey' s Manual® of Determinative Bacteriology** – 9th ed. 1994 Rev. ed. Of: Shorter Bergey's manual of determinative bacteriology.

IACONIS, J. P. e SANDERS, C. C. **Purification and Characterization of Inducible β -Lactamases in *Aeromonas* spp.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Jan. 1990, p. 44-51

KASKHEDIKAR, A. e CHHABRA, D. **Muliple drug resistance in *Aeromonas hydrophila* isolates of fish**. Veterinary World, Vol. 3 No. 2 February 2010

KOZIŃSKA, A. e PEKALA, A. **serotyping of *Aeromonas* species isolated from Polish fish farms in relation to species and virulence phenotype of the bacteria**. Bull Veterinary Institute Pulawy 54, 315-320, 2010

KRUMPERMAN, P. H. 1983. **Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods** . Applied and Environmental Microbiology 46(1): 165-170

JACOBS, L., CHENIA, H. Y. **Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African**

aquaculture systems. International Journal of Food Microbiology 114 (2007) 295-306

JUN, J. W., KIM, J. H., GOMEZ, D. K., CHORESCA JUNIOR, C. H., HAN, J. E., SHIN, J. P., PARK, S. C. **Occurrence of tetracycline-resistant *Aeromonas hydrophila* infection in Korean cyprinid loach (*Misgurnus anguillicaudatus*).** African Journal of Microbiology Research Vol. 4(9), pp. 849-855, 4 May, 2010

JUTFELT, F., SUNDH, H., GLETTE, J., MELLANDER, L., THRANDUR BOJRNSSON, B., SUNDELL, K. **The involvement of *Aeromonas salmonicida* virulence factors in bacterial translocation across the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), intestine.** Journal of Fish Diseases 2008, 31, 141-151

LE MOS, J. B., RODRIGUES, M.A E., LOPES, J. P., **diagnóstico de ectoparasitas e bactérias em tilápias (*Oreochromis niloticus*) cultivadas na região de Paulo Afonso, Bahia** – Veterinária Brasileira Engenharia de Pesca 1(1), ago. 2006

LIMA, R. M. S., FIGUEIREDO, H. C. P., FARIA, F. C., PICOLLI, R. H., BUENO FILHO, J. S. S., LOGATO, P. V. R. **resistência a antimicrobiana de bactérias oriundas de ambiente de criação e filés de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*).** Ciência agrotécnica Lavras, v. 30, n. 1, p. 126-132, janeiro e fevereiro, 2006

LOPÉZ, C. M.; SAMPAIO, E. V. **Sobrevivência e crescimento larval do pacamã *Lophisilurus alexandri* Steindachner 1877 (Siluriformes, Pimelodidae), em função de três densidades de estocagem em laboratório.** Acta Scientiarum 22(2):491 – 494, 2000.

MAILAFIA, S. e NOK, A. J. **spectrophotometric determination of protins associated with virulence in Nigerian strains of *Aeromonas* species.** Bajopas Volume 2 Number 1 June, 2009

MIRANDA, C. D. e ZEMELMAN, R. **Antimeicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms.** The Science of the Total Environment 293 (2002) 207-218

MOLINARI, L. M., SCOARIS, D. O., PEDROSO, R. O., BITTENCOURT, N. L. R., NAKAMURA, C. V., UEDA-NAKAMURA, T., ABREU FILHO, A., DIAS FILHO, B. P. **Bacterial microflora in the gastrointestinal tract of Nilo tilapia, *Oreochromis niloticus*, cultered in a semi-intensive system.** Acta Scientiarum. Biological Sciences, Maringá, v. 25, no.2, p. 267-271, 2003

NAM, I.-Y. e JOH, K., **Rapid Detection of Virulence Factors of *Aeromonas* Isolated from a Trout Farm by Hexaplex-PCR.** The Journal of Microbiology, August, 2007 p. 297-304.

NEWAJ-FYZUL, A., MUTANI, A., RAMSUBHAG, A., ADESIYUN, A. **Prevalence of Bacterial Pathogens and their Anti-microbial Resistance in Tilapia and their Pond Water in Trinidad.** Zoonoses and Public Health 55 (2008) 206-213.

OBRITSCH, M. D., FISH, D. N., MACLAREN, R., JUNG, R. **National Surveillance of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Obtained from Intensive Care Unit.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Decembre 2004, Vol. 48, No. 12 p. 4606–4610.

OROZOVA, P. CHIKOVA, V., KOLAROVA, V., NEVORA, R., KONOVSKA, M., NAJDENSKI, H. **ANTIBIOTIC RESISTENCE OF POTENTIALLY PATHOGENIC *Aeromonas* STRAINS.** Trakia Journal of Sciences, Vol. 6, Suppl. 1, pp 71-77, 2008

PEREIRA, C. S., POSSAS, C. A., VIANA, C. M., RODRIGUES, D. P. **Características de *Vibrio parahaemolyticus* isolados de mexilhões (*Perna perna*) comercializados em Niterói, Rio de Janeiro.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 40(1):56-59, janeiro fevereiro, 2007

PEREIRA, C. S., AMORIM, S. D., SANTOS, A. F. M., REIS, C. M. F. THEOPHILO, G.

N. D. e RODRIGUES, D. P. **Caracterização de *Aeromonas* spp. isoladas de neonatos hospitalizados.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 41 (2):179-182, março abril, 2008

QUINN, P. J., CARTER, M. E., MARKEY, B., CARTER, G. R. **Clinical veterinary Medicine**, London: Mosby-Year ed., 1994, 648p.

SAAVEDRA, M. J., BRITO, R. D., SOUSA, M. ALVES, A. REMA, P. **Isolamento de *Pasteurella* spp. e *Vibrio* spp. em robalos (*Dicentrarchus labrax*) Susceptibilidade a diferentes grupos de antibióticos.** Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia, v.56, n.2, p.277-279, 2004

SARTER, S., NGUYEN, H. N. K., HUNG, L. T., LAZARD, J., MONTET, D. **Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria isolated from farmed catfish** Food Control 18 (2007) 1391-1396.

SENGELOV, G. e SORENSEN, S. J. **Methods for Detection of Conjugative Plasmid Transfer in Aquatic Environments.** Current Microbiology Vol. 37 (1998), pp. 274-280.

SEN, K. e RODGERS, M. **Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification.** Journal of Applied Microbiology 2004, 97, 1077-1086

SHAMA, S., BRANDÃO, D. A., VARGAS, A. C., COSTA, M. M., PEDROZO, A. F. **bactérias com potencial patogênico nos rins e lesões externas de jundiás (*Rhamdia quelen*) cultivados em sistema semi-intensivo,** Ciências Rural, Santa Maria, v. 30, n. 2, p. 293-298, 2000

SILVA, R. M. L., ROSSI JÚNIOR, O. D., COSTA, F. N., CHAVES N. P., NASCIMENTO, D. L., KAMIMURA, B. A. ***Aeromonas* spp. em água de piscicultura da região da baixada ocidental maranhense.** Bol. Inst. Pesca, São Paulo, 36 (3): 245-249, 2010

SILVA, L. J. *Aeromonas hydrophila* em organismos aquáticos no Vale do São Francisco: **Fatores de virulência e perfil de resistência à antimicrobianos e metais** pesados/ Luciana Jatobá e Silva. – Petrolina, PE, 2011. 61f.: Il.

SMITH, P. R.; BRETON, A. L.; HORSBERG, T. E.; CORSIN, F. Guidelines for antimicrobial use in aquaculture. In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. **Guia de Antimicrobianos em Veterinária**. Porto Alegre:Artmed, pag. 2010.

SOUSA, J. A., e SILVA-SOUZA, A. T. **Bacterial Community Associated with Fish and Water from Congonhas River, Sertaneja, Paraná, Brazil**. Brazilian Archives of Biology and Technology, an International Journal, vol. 44, n. 4: pp. 373-381, December, 2001

TSUGAWA, H., ITO, H., OHSHIMA, M. e OKAWA, Y. **Cell adherence-promoted activity of *Plesiomonas shigelloides* GroEL**. Journal of Medical Microbiology (2007), 56, 23–29

WARD, L. N. e BEJ, A. K. **Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in Shellfish by Use of Multiplexed Real-Time PCR with TaqMan Fluorescent Probes**. Applied and Environmental Microbiology, Mar. 2006, p. 2031–2042

YAGOUB, S. O. **Isolation of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. from raw fish sold in fish market in Khartoum state**. Journal of Bacteriology Research Vol. 1(7), pp. 085-088, October, 2009.

ZAKY, M. M. M., MANSOUR, F. A. e PERSSON, K. M. **Factors influencing multi-drug resistant and plasmid DNA harbouring *Aeromonas hydrophila* isolated from Lake Manzala, Egypt**. Journal of Bacteriology Research Vol. 2(4), pp. 30-40, September 2010.

Artigo 4.2

Produção de biofilme em isolados patogênicos de *Aeromonas hydrophila* obtidas de Pacamã (*Lophiosilurus alexandri*).

Francisco Gilvan Bezerra dos Santos, Gisele Veneroni Gouveia, Mateus Matiuzzi da Costa

RESUMO

O biofilme é uma estrutura comumente associada à resistência aos antimicrobianos e a colonização de diferentes hospedeiros. Em *Aeromonas* spp. o biofilme tem sido associado ao estímulo do sistema imunológico, sendo desta forma muito útil no preparo de vacinas. Este trabalho teve como objetivo identificar através de técnicas fenotípicas e molecular a habilidade para produção de biofilme em isolados de *Aeromonas hydrophila*. Foram utilizados vinte e sete isolados de *A. hydrophila* obtidas de juvenis enfermos de pacamã (*Lophiosilurus alexandri*) foram submetidos aos testes fenotípicos violeta de genciana e DAPI - 4,6-diamino-2-fenilindol e a um molecular (PCR para o gene que codifica o flagelo lateral). Observou-se a formação de biofilmes em 100% dos isolados quando avaliados para os dois testes fenotípicos. Os resultados da PCR demonstraram que 48,15% das amostras foram positivas. Na análise comparativa dos resultados fenotípicos e molecular pelo teste KAPPA, uma fraca associação foi observada. Devido à maior subjetividade na interpretação dos testes fenotípicos, a PCR pode se mostrar mais específica para detecção do biofilme nos isolados ictiopatogênicos de *A. hydrophila*. No entanto, outros genes que participam da expressão de flagelos laterais e formação de biofilme podem estar atuando, o que resultaria nas verificações positivas para biofilme pelos testes fenotípicos.

Palavras-chave: *Aeromonas* spp., teste KAPPA, ELISA, Violeta de Genciana, DAPI e PCR

Artigo 4.2

Biofilm production of pathogenic isolates of *Aeromonas hydrophila* from Pacamã
(*Lophiosilurus alexandri*).

Francisco Gilvan Bezerra dos Santos, Gisele Veneroni Gouveia, Mateus Matiuzzi da Costa

ABSTRACT

Biofilm is a structure commonly associated with antimicrobial resistance and infection of different hosts. In *Aeromonas* spp. the biofilm has been associated with immune system improve and may be useful in vaccines preparations. Our study aimed to identify by using the phenotypical and molecular techniques the ability of biofilm production in *Aeromonas hydrophila* isolates. Twenty seven isolates of *A. hydrophila* obtained from diseased pacamãs (*Lophiosilurus alexandri*) were submitted to de gentian violet and DAPI - 4,6-diamino-2-fenilindol tests and genotypic always (PCR to lateral flagellum gene). We detect the biofilm formation in 100% of tested isolates in both phenotypical tests. In the PCR 48.15% of *Aeromonas* spp. were considered positive. In the comparative analysis of phenotypical and molecular methods by kappa test a weak association was observed. Due to the subjectivity in the results interpretation of phenoptypical tests, the PCR can be more specific to biofilm detection in the ictiopathogenic isolates of *A. hydrophila*. Nevertheless, other genes may contribute to expression of lateral flagellum and biofilm, that could explain the variation in the results described here.

Key-Words: *Aeromonas* spp., teste KAPPA, ELISA, Violeta de Genciana, DAPI e PCR

INTRODUÇÃO

Aeromonas spp. são bactérias Gram negativas que habitam predominantemente ambientes aquáticos. O gênero *Aeromonas* possui um grande número de espécies que são patógenos oportunistas, com capacidade de causar doenças em humanos e animais (ABOTT et al., 2003). Em peixes essa bactéria causa septicemia hemorrágica, apodrecimento de barbatanas e de tecidos e furunculose. Em humanos causa diarreia, gastroenterite, septicemia, endocardite, meningite e pneumonia (BUCKELY e HOWARD, 1999).

Estas bactérias são capazes de produzir uma variedade de enzimas, tais como, elastase, amilase, nuclease, lipase, protease, gelatinase e lecitinase, que são descritas como fatores de virulência para peixes e humanos (NAMBA et al., 2007). Além da produção dessas enzimas, *Aeromonas* spp. apresentam capacidade de formar biofilme em intervalos de 24 horas (LI et al., 2007). A formação dessa estrutura pode ser também considerada como um importante fator de virulência uma vez que constituem uma forma de colonizar seus hospedeiros (SANTOS et al., 2010), fazendo comunicação com diferentes gêneros bacterianos de ambientes aquáticos (*quorum sensing*) e sendo preservadas por longos períodos (RICKARD et al., 2003).

O biofilme é uma estrutura constituída por células bacterianas mortas e diferentes tipos de biomoléculas, tais como peptideoglicanos e lipídios o que favorece sua agregação na superfície das células hospedeira, permitindo à bactéria uma sobrevivência prolongada, causando infecções crônicas e com significantes índices de resistência antimicrobiana (TIBA et al., 2009). A resistência derivada da formação de biofilme pode ser explicada pela presença de um polímero hidrofílico que reveste o biofilme, impossibilitando a ação dos agentes antimicrobianos, pois os mesmos são incapazes de penetrar nessa estrutura (SMITH, 2010).

Em diversos microrganismos, incluindo *Aeromonas* spp., um importante componente na produção de biofilme é a motilidade (*swarming*) mediada pela presença de flagelos (HOUDT e MICHIELS, 2005). Cepas de *Aeromonas* geralmente apresentam um flagelo polar, entretanto, também podem expressar múltiplos flagelos laterais (KIROV et al., 2004). Flagelos polares são expressos constitutivamente e permitem que as bactérias se movimentem em meio líquido. Em

meios onde o flagelo polar é incapaz de impulsionar a bactéria, algumas cepas de *Aeromonas* expressam flagelos laterais que proporcionam a mobilidade em matriz sólida, a colonização de superfícies e o aumento de aderência. Flagelos laterais podem atuar como adesinas em células epiteliais do intestino humano (SHIMADA et al, 1985; GAVÍN et al., 2003; KIROV et al., 2004).

Nove genes relacionados à produção de flagelo lateral (*laf* A a U) foram identificados e caracterizados em *A. hydrophila* e quatro genes (*laf*A1 e A2, *laf* B e *fli*U) em *A. caviae*. Mutações nesses genes foram associadas com a perda de flagelo lateral, redução de aderência e formação de biofilme (GAVÍN, et al. 2002). A introdução do gene *laf* em espécies de *Aeromonas* foi relacionada ao aumento da capacidade de mutantes em invadir, aderir e produzir biofilme (GAVÍN et al., 2003).

Objetivou-se com esse estudo identificar a presença de biofilme através de provas fenotípicas em *Aeromonas* isoladas de peixes do Submédio do Vale São Francisco, realizar a detecção do gene *laf* (flagelo lateral) através da técnica molecular da Reação em Cadeia da Polimerase e fazer análise de concordância entre os métodos fenotípicos e molecular empregados.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado na Estação de Piscicultura do Bebedouro da Companhia de Desenvolvimento dos Vales do Parnaíba e do São Francisco – CODEVASF e no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF no Colegiado de Zootecnia no Campus de Ciências Agrárias. Foram utilizados para o estudo 27 isolados de *A. hydrophila* obtidas de juvenis de pacamã (*L. alexandri*), provenientes da Estação de Piscicultura de Bebedouro. Todos os animais estavam enfermos no momento da coleta. As bactérias foram previamente identificadas para o gênero *Aeromonas* através da técnica de PCR para o gene 16S, seguido por restrição enzimática, conforme descrições em SILVA (2011).

Para a caracterização da produção fenotípica de biofilme foram utilizados dois testes, o violeta de genciana e o de fluorescência emitida pelo DAPI. Como controle negativo para estes testes foi utilizado um isolado de *Escherichia coli* DH5-alfa que não forma biofilme. No teste de violeta de genciana MERINO et al. (2009), os

isolados de *Aeromonas hydrophila* foram incubados em três mililitros de TSB (Tryptone Soya Broth) e incubados a 27°C por 24 horas. Em seguida, foram retirados 5 µl e aplicados em microplacas estéreis contendo 195µl de TSB e novamente incubadas a 27°C por 24 horas. Passada essa etapa, todas as amostras foram lavadas em 200 µl de água destilada por três vezes e, em seguida coradas com 100 µl de uma solução de violeta de genciana a 0,25% e expostas de 2 a 3 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as microplacas foram lavadas por mais três vezes com água destilada e 200 µl de álcool-acetona (80:20). A absorbância foi medida em leitor de ELISA (Leitora ELISA ASYS EXPERT PLUL BioChrom) e a absorbância mensurada em filtro de 595 nm. A intensidade da produção de biofilme foi medida pela quantidade de violeta de genciana remanescente nos poços, sendo esta maior que a observada para o controle negativo. Os testes foram realizados em triplicata (MERINO et al., 2009). Seguindo a descrição de CHRISTENSEN et al. (1985) a produção de biofilme foi classificada em três categorias. Para isso, primeiramente foi definido como (densidade óptica) OD de ponto de corte (ODc) a média da OD do controle negativo (de *Escherichia coli* DH5-alfa). Em seguida, os isolados foram classificados nas seguintes categorias: não aderentes (-: $OD \leq ODc$), fraca a moderadamente aderentes (+: $ODc < OD \leq 2X ODc$) e fortemente aderente (++: $2X ODc < OD$) CHRISTENSEN et al. (1985).

Para o teste de fluorescência do DAPI (LEICA BM 2000) foi utilizado um protocolo descrito por BREDHOLT et al. (1999). Neste teste, as amostras foram incubadas em 3 mililitros de TSB por um período de 24h a 27°C. Após este período, 5 µl do cultivo foram utilizados para inocular placas de Petri estéreis contendo lamínulas estéreis imersas no seu interior, sendo estas incubadas por mais 24h a 27°C. Na seqüência foi aplicado 3 a 6 µl de uma solução (2 µg/ml) do corante DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol), o que se liga ao DNA bacteriano presente no biofilme e fluoresce quando submetido a análise em microscópio de fluorescência (LEICA BM 2000), objetiva de 100x e filtro de 05, absorção: 395nm e emissão: 440nm. As amostras foram produtoras de biofilme quando se observava uma fluorescência difusa azul.

A PCR para determinação da produção de biofilme nos isolados de *A. hydrophila* foi realizada pela detecção de um dos genes associados à produção do flagelo lateral o gene *laf*. Para tal, o DNA dos isolados foi termoextraído de acordo

com SILVA, (2011). No preparo da PCR foram empregados: Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), MgCl₂ 2,6 mM, KCl 50 mM, 0,4 µM de cada dNTP, 0,8 µM de cada *primer*, 2,5 unidades de Taq DNA Polimerase e 10 µl de DNA genômico em um volume final de 25 µl. A reação de amplificação constou de uma desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento, a 58°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por 30 segundos. Após os 35 ciclos, o produto amplificado foi submetido à extensão final por 10 minutos. Devido a problemas com a amplificação dos *primers* descritos na literatura (GAVÍN et al., 2003), novos *primers* foram desenhados com a utilização do programa Primer3 Plus (Disponível em <http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi>). A qualidade dos *primers* foi verificada no site <<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>>, tomando-se cuidado para optar por *primers* que possuísem ΔG maior que zero (ideal para que reações espontâneas não ocorram) ou o mais próximo de zero, que não formassem *hairpin* (*primers* auto complementares) ou que formassem o menor número possível de *hairpins*. Os *primers* *LafA_F* 5'CTTCCATGACCACCCAGAAC3' e *LafA_R* 5'TTTGGAAAGTCACACCACCA3' amplificaram um fragmento de 432 pb em um termociclador (Amplitherm Thermal Cyclers). Em seguida os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio, e visualizados sobre iluminação ultravioleta em transluminador (Transiluminator Loccus Biotecnologia).

Uma análise de concordância dos testes fenotípicos com o teste molecular foi realizada por meio do teste KAPPA (THRUSFIED, 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse estudo foram utilizadas duas técnicas de coloração para detecção de presença de biofilme, uma com violeta genciana e outra com DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol). Foram observadas como positivos para a formação de biofilme todos os isolados analisados segundo os dois testes fenotípicos utilizados. A média da OD da triplicata do controle negativo foi de 0,069. Seguindo a classificação descrita por CHRISTENSEN et al. (1985) para formação de biofilme, que considera como positiva uma OD maior ou igual ao da amostra controle, todos os isolados

demonstraram habilidade de formação de biofilme, sendo que 37,04% dos isolados foram classificados como fracos a moderadamente aderentes e 62,96% dos isolados foram classificados como fortemente aderentes.

Dos 27 isolados de *Aeromonas* analisados, 48,15% apresentaram o gene *laf*. Outros trabalhos também vêm constatando de média a alta a presença desse gene em *Aeromonas*. MERINO et al. (2003) detectaram a presença desse gene em 100% dos isolados de *Aeromonas salmonicida* de peixes doentes estudados no Japão, Canadá, Estados Unidos da América, Reino Unido e Espanha e AGUILERA-ARREOLA et al. (2005) verificaram a presença do gene *laf* em 84% dos isolados de *Aeromonas hydrophila* avaliados. Um trabalho realizado por GAVÍN et al. (2003) apresentou 60% de seus isolados positivos para o gene *laf*. Eles encontraram uma correlação de 100% entre a presença do gene *laf* nos isolados, por hibridização, dessas colônias com uma sonda específica a esse gene. Também encontraram completa correlação entre a presença desse gene e a formação de biofilme, presença de flagelo lateral e produção de flagelina lateral. O trabalho de GAVÍN et al. (2003) ainda demonstrou que a presença do gene *laf* aumentou a capacidade de cepas de aderir e de invadir células formando biofilmes *in vitro*. Assim, os isolados positivos para o gene *laf* aqui estudados teriam grande potencial patogênico e de formação de biofilme.

Em *Aeromonas hydrophila* 55 genes participam da codificação do flagelo polar (CANALS et al., 2006a) e 38 genes estão envolvidos na indução e síntese do flagelo lateral (CANALS et al., 2006b). Um dos principais genes que tem sido apontado pela literatura como contribuinte da formação do flagelo polar e de biofilme é o gene *fla* (GAVÍN et al., 2002; SANTOS et al., 2010), enquanto para a formação do flagelo lateral é o gene *laf* (GAVÍN et al., 2003). No presente estudo, 100% dos isolados positivos para a PCR do gene *laf* foram classificados como fortemente aderentes segundo o método descrito por CHRISTENSEN et al. (1985), demonstrando a correlação entre dados fenotípicos e moleculares. No entanto, para os isolados que apresentaram a ausência do gene *laf*, 41,17% foram classificados como altamente aderentes e 58,83% dos isolados foram considerados como fracos a moderadamente aderentes. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que a formação dos flagelos polar e lateral é influenciada por vários outros genes, tais

como o gene *fla*. Desta forma, a formação de biofilme seria derivada da ação de outros genes que não o gene *laf*.

O teste KAPPA demonstrou uma concordância de 0,14 entre a coloração com violeta genciana e a PCR para o gene *laf* (**Tabela 3**). Este valor é considerado pobre, ou seja, é pouco confiável. Para a coloração com DAPI o mesmo teste de concordância foi aplicado e o resultado foi zero (**Tabela 4**), isto é, não houve concordância entre os resultados dos dois testes, demonstrando que o resultado obtido pelo teste fenotípico aplicado à segunda técnica, não possui correlação com a presença do gene *laf* e a produção de biofilme nos isolados. A interpretação dos testes fenotípicos segue um padrão subjetivo, passível de obtenção de diferentes resultados, se realizados por diferentes técnicos, já a PCR é uma técnica cujos resultados são reproduzíveis em diferentes laboratórios, apresentando maior confiabilidade nos resultados. Além disso, a formação de flagelos laterais é influenciada por outros genes e, a formação de biofilme poderia estar sendo derivada da ação desses outros genes. Um resultado definitivo somente seria possível se outros genes para formação de biofilme fossem estudados nesses isolados.

Tabela 3. Concordância entre os resultados obtidos nos teste de Violeta genciana - VG e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em isolados de *Aeromonas hydrophila* obtidos em pacamãs (*Lophiosilurus alexandri*)

	PCR		Total	KAPPA
	+	-		
VG +	13	12	25	.
-	0	2	2	.
Total	13	14	27	0,14

Onde: + : resultado positivo; -: resultado negativo, valores de KAPPA <0,20=pobre, 0,21-0,40=fraco, 0,41-0,60=moderado, 0,61-0,80=boa e >0,80=muito boa

Tabela 4. Concordância entre os resultados obtidos nos teste de 4,6-diamino-2-fenilindol - DAPI e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em isolados de *Aeromonas hydrophila* obtidos em pacamãs (*Lophiosilurus alexandri*)

	PCR		Total	KAPPA
	+	–		
DAPI +	13	14	27	.
–	0	0	0	.
Total	13	14	27	0

Onde: + : resultado positivo; -: resultado negativo; valores de KAPPA <0,20=pobre, 0,21-0,40=fraco, 0,41-0,60=moderado, 0,61-0,80=boa e >0,80=muito boa

CONCLUSÃO

Foi possível a identificação da presença do gene *laf*, relacionado à produção de biofilme, com a utilização da técnica da PCR nos isolados avaliados de pacamã. No entanto, os resultados revelados pelos testes fenotípicos expressaram baixa concordância (violeta de genciana) ou não apresentaram concordância (DAPI - 4,6-diamino-2-fenilindol) com os resultados obtidos pela PCR, demonstrando a subjetividade desses testes ou a múltipla ação de genes na formação de biofilme. Diante desses resultados o método mais indicado seria a Reação em Cadeia de Polimerase para múltiplos genes relacionados à formação de biofilme. Este trabalho proporcionou o início da caracterização molecular de espécies nativas da Bacia do São Francisco, na Estação de Piscicultura de Bebedouro da CODEVASF, contribuindo com a piscicultura.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, S. L., CHEUNG, W. K. W., JANDA, J. M. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 2348-2357, 2003.

AGUILERA-ARREOLA, M.G., HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C., ZÚÑIGA, G., FIGUERAS, M.J., CASTRO-ESCARPULLI, G. (2005) *Aeromonas hydrophila* clinical and environmental ecotypes as revealed by genetic diversity and virulence genes. *FEMS Microbiol Lett* 242, 231–240.

BREDHOLT, S., SONNE-HONSEN, J., NIELSEN, P., MATRANI, I. M., AHRING, B. K. ***Caldicellulosiruptor kristjanssonii* sp. Nov., a cellulolytic, extremely thermophilic, anaerobic bacterium.** *International Journal of Systematic bacteriology* (1999), 49, 991-996

BUCKLEY, J. T., S. P. HOWARD. 1999. The cytotoxic enterotoxin *Aeromonas hydrophila* is aerolysin. *Infect. Immun.* 67, 466-467.

CANALS, R., ALTARRIBA, M., VILCHES, S., HORSBURGH, G., SHAW, J.G., TOMÁS, J.M., MERINO, S. (2006a) Analyses of lateral flagella gene system of *Aeromonas hydrophila* AH-3. *J Bacteriol* 188, 852–862.

CANALS, R., RAMIREZ, S., VILCHES, S., HORSBURGH, G., SHAW, J.G., TOMÁS, J.M., MERINO, S. (2006b) Polar flagellum biogenesis in *Aeromonas hydrophila*. *Journal Bacteriol* 188, 542–555.

CHRISTENSEN, G. D., SIMPSON, W. A., YOUNGER, J.J., BADDOUR, L. M., BARRETT, F. F., MELTON, D. M., BEACHEV, E.H. (1985) Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence

GAVÍN, R., RABAAAN, A. A., MERINO, S., TOMÁS, J. M., GRYLLOS, I. and SHAW, J. G. (2002) Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 43, 383-397.

GAVÍN, R., S. MERINO, M., ALTARRIBA, R., CANALS, J. G., SHAW, J. M., TOMÁS, J. M. 2003. Lateral flagella are required for increased cell adherence, invasion and biofilm formation by *Aeromonas* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* 224, 77-83.

HOUDT, V. R. & MICHIELS, C. W. **Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation.** *Research in Microbiology* 156 (2005) 626–633

KIROV, S.M., M. CASTRISIOS, J.G. SHA. 2004. *Aeromonas* flagella (polar and lateral) are enterocyte adhesions that contribute to biofilm formation on surfaces. *Infect. Immun.* 72, 1939-1945.

LI, M., PENG, L. JI, Z., XU, J., LI, S. **Establishment and characterization of dual-species biofilms formed from a 3,5-dinitrobenzoic-degrading strain and bacteria with high biofilm-forming capabilities.** *FEMS Microbiol Lett* 278 (2008) 15–21

MERINO, N., TOLEDO-ARANA, A., VERGARA-IRIGARAY, M., VALLE, J., SOLANO, C., CALVO, E., LOPEZ, J. A., FOSTER, T. J., PENADÉS, J. R., LASA, I., **Protein A-Mediated Multicellular Behavior in *Staphylococcus aureus*,** *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, Feb. 2009, p. 832-843

MERINO, S., GAVÍN, R., VILCHES, S., SHAW, J., TOMÁS, J. M. (2003) A colonization factor (production of lateral flagella) of mesophilic *Aeromonas* spp. Is inactive in *Aeromonas salmonicida* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 663–667.

NAMBA, A., MANO, N., HIROSE, H. **Phylogenetic analysis of intestinal bacteria and their adhesive capability in relation to the intestinal mucus of carp.** *Journal of Applied Microbiology* 102 (2007) 1307–1317

PRIMER3 PLUS <[HTTP://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3](http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3)> e
<<http://www.idtdna.com/analyser/Applications/oligoAnalyzer/>>

RICKARD, A. H., McBAIN, A. J., LEDDER, R. G., HANDLEY, P. S. GILBERT, P.
Goaggregation between freshwater bacteria within biofilm and planktonic communities. FEMS Microbiology Letters 220 (2003) 133-140

SANTOS, P. G., SANTOS, P. A., BELLO, R. A., FREITAS-ALMEIDA, A. C.
Association of *Aeromonas caviae* polar and lateral flagella with biofilm formation. Letters in Applied Microbiology 52, 49–55 2010

SHIMADA, T., SAKAZAKI, R., SUZUKI, K. 1985. Peritrichous flagella in mesophilic strains of *Aeromonas*. Jpn. J. Med. Sci. Biol. 38:141–145.

SILVA, L. J. *Aeromonas hydrophila* em organismos aquáticos no Vale do São Francisco: Fatores de virulência e perfil de resistência à antimicrobianos e metais pesados/ Luciana Jatobá e Silva. – Petrolina, PE, 2011. 61f.: Il.

SMITH, P. R.; BRETON, A. L.; HORSBERG, T. E.; CORSIN, F. Guidelines for antimicrobial use in aquaculture. In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H.
Guia de Antimicrobianos em Veterinária. Porto Alegre:Artmed, pag. 2010.

THRUSFIEL, M. V. **Epidemiologia Veterinária.** 2ª Ed. Roca, São Paulo, 2004. 556p.

TIBA, M. R., NOGUEIRA, G. P., LEITE, D. S. **Estudo dos fatores de virulência associados à formação de biofilme e agrupamento filogenético em *Escherichia coli* isoladas de pacientes com cistite.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 42(1): 58-62, janeiro fevereiro, 2009

5. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Aeromonas hydrophila, *A. media*, *A. salmonicida*, *Acinetobacter* spp., *Enterobacter aerogenes*, *E. agglomerans*, *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Plesiomonas shigelloides*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Shigella sonnei*, *Vibrio metschnikovii* e *V. parahaemolyticus* (forma a microbiota do) ocorrem em pacamãs (*Lophiosilurus alexandri*) .

Nas condições estabelecidas no presente estudo a foi demonstrado que a *Aeromonas hydrophila* corresponde à espécie de maior número de isolados na microbiota do pacamã (*Lophiosilurus alexandri*).

A identificação bioquímica, mesmo subjetiva permitiu a classificação dos isolados de bactérias do pacamã (*L. alexandri*).

Devido à resistência múltipla aos fármacos observada nesta pesquisa aos fármacos estudados, todos eles de amplo uso na piscicultura, faz-se necessário cautela redobrada durante a administração de tais drogas no controle de enfermidades em peixes. Com destaque para os grupos dos beta lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas.

Os isolados de *Aeromonas hydrophila* demonstraram habilidade para produção de biofilme tanto nos testes fenotípicos quanto molecular.

6 - REFERÊNCIAS

- ABDEL-HADI, Y. M., SHAMSUDIN, M. N., YUSOFF, K., ZAKARIA, S. **Indoor Study on the Immunization of Red Tilapia: *Oreochromis niloticus* x *O. mossambicus* Against Aeromonad and Pseudomonad Septicemias**, Journal of Fisheries International 4 (3): 45-51, 2009
- ABDULLAH, A. I., HART, C. A. e WINSTANLEY, C. **Molecular characterization and distribution of virulence-associated genes amongst *Aeromonas* isolates from Libya**, Journal of Applied Microbiology 2003, 95, 1001 – 1007
- ABULHAMD, A. T., **Characterization of *Aeromonas hydrophila* Isolated from Aquatic Environments Using Phenotypic and Genotyping Methods**, Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 5(6): 923-931, 2009
- ADANIR, D. O. R. e TURUTOGLU, H. **ISOLATION AND ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY OF *Aeromonas hydrophila* IN A CARP (*Cyprinus carpio*) HATCHERY FARM**, Bull vet Inst Pulawy 51, 361-364, 2007
- ALVIM, M. C. C. e PERET, A. C. **Food resources sustaining the fish fauna in a section of the UPPER São Francisco River in Três Marias, MG, Brazil**. Braz. J. Biol., 64(2): 195-202, 2004
- ANDRADE, N. P. C., MESSIAS FILHO, F., CARRERA, M. V., SILVA, L. J., FRANCO, I., COSTA, M. M. **Microbiota bacteriana do *Macrobrachium amazonicum* do Rio São Francisco**. Acta Veterinaria Brasilica, v.4, n.3, p.176-180, 2010.
- BARJA, J. L. e ESTEVES, A. T. **Patologia em Acuicultura**. Espanha: Caicvt. 1988. **Enfermidades bacterianas: 550p.** (Appud: BOIJINK, C. L., & BRANDÃO, D. A. **inoculação bacteriana *Aeromonas hydrophila* e a sobrevivência de juvenis de jundiás, *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI: PIMELODIDAE)** Ciência Rural, Santa Maria, v.31, n.3, p.503-507, 1998.

BELÉM-COSTA, A. e CYRINO, J. E. P. **ANTIBIOTIC RESISTENCE OF *Aeromonas hydrophila* ISOLATED FROM *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) AND *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)** Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.),v.63, n.3, p.281-284, May/June 2006

BLACKBURN, J. K., MITCHELL, M. A., BLACKBURN, M-C. H., CURTIS, A. AND THOMPSON, B. A. **evidence of antibiotic resistance in free-swimming, top-level marine predatory fishes.** Journal of Zoo and Wildlife Medicine 41(1): 7-16, 2010

BOIJINK, C. L. e BRANDÃO, D.A. **Inoculação Bacteriana de *Aeromonas hydrophila* e a Sobrevivência de juvenis de jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae).** Ciência Rural, Santa Maria, v.31, n.3, p.503-507, 2001

BOIJINK, C. L., BRANDÃO, D. A., VARGAS, A. C., COSTA, M. M., RENOSTO, A. V. **inoculação de suspensão bacteriana de *Plesiomonas shigelloides* em jundiás, *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI: PIMELODIDAE),** Ciência Rural, Santa Maria, v.31, n.3, p.497-501, 2001

BOIJINK, C. L. e BRANDÃO, D.A. **avaliação de suspensões bacterianas de *Aeromonas hydrophila*, em juvenis de jundiás, *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae).** Biodiversidade Pampeana, PUCRS, Uruguaiana 2:3-8, 28 de dezembro de 2004

BORCHARDT, M. A., STEMPER, M. E., STANDRIDGE, J. H. ***Aeromonas* Isolates from Human Diarrheic Stool and Groundwater Compared by Pulsed-Field Gel Electrophoresis.** Emerging Infectious Diseases Vol. 9, No. 2, February 2003

CABELLO, F. C. **Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture a growing problem for human and animal health and for the environment.** Environmental Microbiology (2006) 8 (7), 1137–1144

CANALS, R., ALTARRIBA, M., VILCHES, S., HORSBURGH, G., SHAW, J. G.,

MERINO S. **Analysis of the Lateral Flagellar Gene System of *Aeromonas hydrophila* AH-3.** Journal of Bacteriology, Feb. 2006, p. 852-862

CASTELLANI, D. e BARRELLA, W., **Caracterização da Piscicultura na Região do Vale do Ribeira – SP.** Ciência. Agrotécnica, Lavras, v. 29, n 1, p. 168-176, janeiro fevereiro 2005

CASTAGNOLLI, N. **Criação de peixes de água doce.** Jaboticabal: FUNEP, 1992. 189 p.

CASTAGNOLLI, N. **Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva** / editado por José Eurico Possebon Cyrino...[et. al.]. Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática - Divisão de Biblioteca e Documentação – ESALQ/USP – São Paulo : TecArt, 2004b.

CASTAGNOLLI, N. Estado da arte da aqüicultura brasileira. p. 1-6. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.M.; CASTAGNOLLI, N. editores. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva.** São Paulo:TecArt. 2004. 533 p.

CHYTHANYA, R.; NAYAK, D. K.; VENUGOPAL, M. N. **Antibiotic resistance in aquaculture.** Infofish International, v. 6, p. 30-32, 1999.

COSTA, M. M., PEIXOTO, R. M., BOIJINK, C. L., CASTAGNA, L., MEURER, F., e VARGAS, A. C. **Sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de Jundiá (*Rhamdia quelen*)** Pesquisa Veterinária Brasileira 28(10):477-480, 2008

COSTA, R. A., VIEIRA, G. H. F., SILVA, G. C., VIEIRA, R. H. S. F., SAMPAIO, S. S. **Susceptibilidade “in vitro” a antimicrobianos de estirpes de *Vibrio* spp. isoladas de camarões (*Litopenaeus vannamei*) e de água de criação destes animais provenientes de uma fazenda de camarões no Ceará – Nota prévia.** Braz. J. vet. Res. anim. Sci., São Paulo, v. 45, n. 6, p. 458-462, 2008.

COSTA-NETO, E. M., DIAS, C. V., MELO, M. N. **O conhecimento ictiológico tradicional dos pescadores da Cidade de Barra, região do médio São Francisco, Estado da Bahia, Brasil.** Acta Scientiarum Maringá, v. 24, n. 2, p. 561-572, 2002

GAVÍN R., RABAAN, A. A., MERINO, S., TOMÁS, J. M., GRYLLOS, I. and SHAW, J.G. (2002) Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. Mol. Microbiol. 43, 383-397

GONÇALVES, E. G. e CARNEIRO, D. J. **Coeficientes de Digestibilidade Aparente da Proteína e Energia de Alguns Ingredientes Utilizados em Dietas para o Pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*).** Revista Brasileira Zootecnia, v.32, n.4, p.779-786, 2003

HATHA, M., VIVEKANANDHAN, A. A., JOICE, G. J., CHRISTOL **Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish,** International Journal of Food Microbiology 98 (2005) 131 – 134

HEWLETT, N. R., SNOW, J. BRITTON, J. R. **The role of management practices in fish kills in recreational lake fisheries in England and Wales,** Fisheries Management and Ecology, 2009, **16**, 248-254

HIRSCH, D., PEREIRA JR. D. J., LOGATO, P. V. R., PICCOLI, R. H., FIGUEIREDO, H. C. P. **identificação e resistência a antimicrobianos de espécies de *Aeromonas* móveis isoladas de peixes e ambientes aquáticos,** Ciência. agrotécnica, v. 30, n. 6, p. 1211-1217, 2006

HOLLIMAN, A. The veterinary approach to trout In: BROWN, I., (Ed.). **Aquaculture for veterinarians:** fish husbandry and medicine, Oxford: Pergamon Press, 1993. cap 14, p.223-247.

HOLT, J. G., KRIEG, N. R., SNEATH, P. H. A., STALEY, J. T., WILLIAMS, S. T. **Bergey' s Manual[®] of Determinative Bacteriology/** [edited by] John G. Holt – 9th

ed. 1994 Rev. ed. Of: Shorter Bergey's manual of determinative bacteriology. Includes index. ISBN 0-683-00603-7

HOWGATE, P. **Review of public health safety of products from aquaculture.** International Journal Food Science and Technology, v. 33, p. 99-125, 1998.

IHERING, R. V. **Da Vida dos Peixes.** Ensaios e Senas de Pescarias. Companhia Melhoramentos, São Paulo, SP.

KIRKAN, S., GOKSOY, E. O., KAYA, O. **Isolation and Antimicrobial Susceptibility of *Aeromonas salmonicida* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey Hatchery Farms,** J. Vet. Med. B 50, 339-342 (2003)

KIROV, S. M., CASTRISIOS, M., SHAW, J. G. ***Aeromonas* Flagella (Polar and Lateral) Are Enterocyte Adhesins That Contribute Biofilm Formation on Surfaces.** Infection and Immunity, 2004, p. 1939–1945

KOZLOVA, E. V., POPOV, V. L., SHA, S., FOLTZ, S. M., EROVA, T. E., AGAR, S. L., HORNEMAN, A. J., CHOPRA, A. K. **Mutation in the S-ribosylhomocysteinase (*luxS*) gene involved in quorum sensing affects biofilm formation and virulence in a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*,** Microbial Pathogenesis 45 (2008) 343-354

KOZINSKA, A., FIGUEIRAS, M. J., CHACON, M. R., SOLER, L. **Phehotypic characteristics and pathogenicity of *Aeromonas* genomospecies isolated from common carp (*Cyprinus carpio* L.),** Journal of Appied Microbiology 2002, 93, 1034-1041

LEMOS, J. B., RODRIGUES, M. E., LOPES, J. P. **Diagnóstico de ectoparasitas e bactérias em tilápias (*Oreochromis niloticus*).** Revista Brasileira de Engenharia de Pesca 1(1), ago. 2006

LIMA, R. M. S., FIGUEIREDO, H. C. P., FARIA, F. C., PICOLLIR. H., FILHO, J. S. S.

B., LOGATO, P. V. R., **resistência a antimicrobianos de bactérias oriundas de ambientes de criação e filés de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**, Ciência e Agrotecnologia, v. 30, n. 1, p. 126-132, 2006

LOPÉZ, C. M. e SAMPAIO, E. V. **Sobrevivência e crescimento larval do pacamã *Lophisilurus alexandri* Steindachner 1877 (Siluriformes, Pimelodidae), em função de três densidades de estocagem em laboratório**. Acta Scientiarum 22(2):491 – 494, 2000.

LUZ, R. K. e SANTOS, J. C. E. **Densidade de estocagem e salinidade da água na larvicultura do pacamã**. Pesquisa agropecuária brasileira, Brasília, v.43, n.7, p.903-909, jul. 2008

MAIA, A. A., CANTISANI, M. L., ESPOSTO, E. M., SILVA, W. C. P., RODRIGUES, E. C. P., RODRIGUES, D. P., LÁZARO, N. S. **Resistência antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* isolados de pescado e de cortes e de miúdos de frango**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 29(1): 114-119, 2009

MANIATI, M., KONTOS, E. P., MANIATIS, A. N. **Antimicrobial susceptibility of *Aeromonas spp.*, *Vibrio spp.* And *Plesiomonas shigelloides* isolated in the Philipines and Thailand**. Journal of Antimicrobial Agents 25 (2005) 345-353

MARQUES, M. B. A., MOREIRA-FILHO, O., GARCIA, C., MARGARIDO, V. P. **Cytogenetic analyses of two endemic from the São Francisco River basin: *Conorhynchus conirostris* and *Lophiosilurus alexandri* (Siluriformes)**. Genetics and Molecular Biology, 31, 1 515-521 (2008)

MARTINS, M. L., MIYAZAKI, D. M. Y., MOURIÑO, J. L. P. ***Aeromonas caviae* durante surto de mortalidade em tilápia do Nilo e suplementação com vitamina C na dieta**, B. Instituto de Pesca, 34(4): 585-590, 2008

MERINO, S., GAVÍN, R., VILCHES, S., SHAW, J. G. AND TOMÁS, J. M. A **Colonization Factor (Production of Lateral Flagella) of Mesophilic *Aeromonas***

spp. Is Inactive in *Aeromonas salmonicida* Strains. Applied and Environmental Microbiology, 2003, p. 663-667

MESSI, P., GUERRIERI, E., BONDI, M, **Antibiotic resistance and antibacterial activity in heterotrophic bacteria of mineral water origin**, Science of the Total Environment 346 (2005) 213 – 219

MEURES, F., HAYASHI, C., BOSCOLO, W. R., SHAMBER, C. R., BOMBARDELLI, R. A. **Fontes Preotéicas Suplementadas com Aminoácidos e Minerais para a Tilápia do Nilo Durante a Reversão Sexual.** Revista Brasileira de Zootecnia, v.34, n.1, p.1-6, 2005

MEURER, F., HAYASHI, C., BARBERO, L. M., SANTOS, L. D., BOMBAEDELLI, R. A., CALPINI, L. M. S. **Farelo de soja na alimentação de tilápias-do-nilo durante o período de reversão sexual.** Revista Brasileira de Zootecnia, v.37, n.5, p.791-794, 2008

MEURER, F., OLIVEIRA, S. T. L., SANTOS, L. D., OLIVEIRA, J. S. COLPINI, L. M. S. **Níveis de oferta de pós-larvas de tilápia do Nilo para alevinos de pacamã (*Lophiosilurus alexandri*)** Veterinária Brasileira e Ciência Agrária Recife, v.5, n.1, p. 111-116, 2010

NAM, I.-Y. e JOH, K., **Rapid Detection of Virulence Factors of *Aeromonas* Isolated from a Trout Farm by Hexaplex-PCR.** The Journal of Microbiology, August, 2007 p. 297-304.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - **Nutrient requirements of warm water, fishes and shellfishes:** nutrient requirements of domestic animals. Washington, D. D., 1993. 22p.

NAYAK, D. K., ASHA, A., SHANKAR, K. M., MOHAN, C. V. **Evaluation of biofilm of *Aeromonas hydrophila* for oral vaccination of *Clarias batrachus* – a carnivore model.** Fish & Shellfish Immunology 16 (2004) 613-619

OSMAN, K. M., MORAMED, L. A., ABDEL RAHMAN, E. H., SOLIMAN, W. S. **Trials for Vaccination of Tilapia Fish Against *Aeromonas* and *Pseudomonas* Infections Using Monovalent, Bivalent and Polyvalent Vaccines.** World Journal of Fish and Marine Sciences 1 (4): 297-304, 2009

O'TOOLE, G. A., KAPLAN, H., KOLTER, R. (2000) **Biofilm formation as microbial development.** Annu Rev Microbiol 54, 49–79.

PEDREIRA, M. M., SANTOS, J. C. E., SAMPAIO, E. V. PEREIRA, F. N., SILVA, J. L. **Efeito do tamanho da presa e do acréscimo de ração na larvicultura de pacamã.** Revista Brasileira de Zootecnia, v.37, n.7, p.1144-1150, 2008

SAAVEDRA, M. J., BRITO, R. D., SOUSA, M. ALVES, A. REMA, P. **Isolamento de *Pasteurella* spp. e *Vibrio* spp. em robalos (*Dicentrarchus labrax*) Susceptibilidade a diferentes grupos de antibióticos.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.56, n.2, p.277-279, 2004

SARTER, S., NGUYEN, H. N. K., HUNG, L. T., LAZARD, J., MONTET, D. **Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria isolated from farmed catfish** Food Control 18 (2007) 1391-1396

SCHUBERT, G. **Fish disease:** A complete introduction. Neptune City T. F. H., 1987, 125p.

SENGELOV, G., SORENSEN, S. J. **Methods for Detection of Conjugative Plasmid Transfer in Aquatic Environments.** Current Microbiology Vol. 37 (1998), pp. 274-280

SHAMA, S., BRANDÃO, D. A., VARGAS, A. C., COSTA, M. M., PEDROZO, A. F. **bactérias com potencial patogênico nos rins e lesões externas de jundiás (*Rhamdia quelen*) cultivados em sistema semi-intensivo,** Ciências Rural, Santa Maria, v. 30, n. 2, p. 293-298, 2000

SOUSA, J. A., e SILVA-SOUZA, A. T. **Bacterial Community Associated with Fish and Water from Congonhas River, Sertaneja, Paraná, Brazil.** Brazilian Archives of Biology and Technology, an International Journal, vol. 44, n. 4: pp. 373-381, December, 2001

TIBA, M. R., NOGUEIRA, G. P. e LEITE, D. S. **Estudo dos fatores de virulência associados à formação de biofilme e agrupamento filogenético em *Escherichia coli* isoladas de pacientes com cistite.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 42(1): 58-62, jan-fev, 2009

TURKER, H., YILDIRIM, A. B., KARAKAS, F. P. **Sensitivity of Bacteria Isolated from Fish to Some Medicinal Plants.** Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 9: 181-186 (2009)

VALENTI, W. C.; PEREIRA, J. A.; BORGHETTI, J. R. **Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável.** Brasília: CNPq; Ministério da Ciência e Tecnologia, 2000. 399 p.

WANG, G., CLARK, C. G., LIU, C., PUCKNELL, C., MUNRO, C. K., KRUK, T. M. C., CALDEIRA, R., WOODWARD, D. L., RODGERS, F. G. **Detection and Characterization of the Hemolysin Genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by Multiplex PCR,** Journal of Clinical Microbiology, Mar. 2003, p. 1048-1054.

YAGOUB, S. O. **Isolation of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. from raw fish sold in fish market in Khartoum state.** Journal of Bacteriology Research Vol. 1(7), pp. 085-088, October, 2009.

YOGANANTH, N., BHAKYARAJ, R., CHANTHURU, A., ANBALAGAN, T., MULLAI NILA, K. **Detection of Virulence Gene in *Aeromonas hydrophila* Isolated from Fish Samples Using PCR Technique,** Global Journal of Biotechnology & Biochemistry 4 (1): 51-53, 2009.