

Instituto Politécnico de Leiria

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar



Comparação da sensibilidade de *Danio rerio*, *Poecilia reticulata* e *Xiphophorus helleri* a *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas aquariorum*

João Pedro Chambel Martins

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a co-orientação do Doutor Rui Pedrosa e da Mestre Teresa Baptista

Novembro de 2011

Instituto Politécnico de Leiria

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar



Comparação da sensibilidade de *Danio rerio*, *Poecilia reticulata* e *Xiphophorus helleri* a *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas aquariorum*

João Pedro Chambel Martins

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a co-orientação do Doutor Rui Pedrosa e da Mestre Teresa Baptista

Novembro de 2011

Título: Comparação da sensibilidade de *Danio rerio*, *Poecilia reticulata* e *Xiphophorus helleri* a *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas aquariorum*

Copyright © João Pedro Chambel Martins

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2011

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação/trabalho de projecto/relatório de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Este espaço é dedicado àqueles que deram a sua contribuição para que esta dissertação fosse realizada. A todos eles deixo aqui o meu sincero agradecimento.

Ao Professor Doutor Rui Pedrosa e à Professora Mestre Teresa Baptista, por toda a disponibilidade e apoio dado ao longo deste trabalho, que como sempre as orientações foram sem dúvida uma preponderante na realização deste trabalho.

À Professora Susana Mendes, pela disponibilidade que como sempre disponibiliza.

À Escola Superior de Tecnologia do Mar pela possibilidade da realização do trabalho experimental no Laboratório de Aquacultura Ornamental.

À Vera Severiano, pela presença e ajuda incondicional em todos os momentos.

RESUMO

Este trabalho teve como objectivo comparar a sensibilidade de três das principais espécies de peixes ornamentais de água doce, *Danio rerio*, *Poecilia reticulata* e *Xiphophorus helleri*, a duas bactérias potencialmente zoonóticas para o Homem, *Aeromonas hydrophila* (SM 30016) e *Aeromonas aquariorum* (DSM 18362).

De forma a efectuar a injeção intraperitoneal, foi necessário determinar a dose ideal de anestésico (MS-222) para cada uma das espécies de peixe estudadas, de modo a permitir o manuseamento dos peixes. Este foi o segundo, mas não menos importante, objectivo deste estudo.

O critério adoptado para definir “dose ideal de anestésico” foi a dose capaz de provocar o plano 4 de anestesia num peixe em menos de 180 segundos, recuperação em menos de 300 segundos e sobrevivência de 100%, quando os animais são submetidos a uma longa exposição (30 minutos). Para tal foram utilizadas diferentes concentrações de anestésico (75-250 mg/l) nas diferentes espécies estudadas.

A sensibilidade para as bactérias foi efectuada pela comparação do valor de dose letal capaz de matar 50% dos peixes (LD₅₀) em 48 horas, através da injeção intraperitoneal de diferentes densidades das referidas bactérias.

As doses ideais de MS-222 foram 75, 100 e 125mg/L para *D. rerio*, 125, 150 e 200 mg/L para *P. reticulata* e 125 e 150 mg/L para a espécie *X. helleri*.

A espécie *Aeromonas hydrophila* revelou-se mais virulenta em todas as espécies de peixes relativamente a *Aeromonas aquariorum*. O LD₅₀ encontrado para a espécie *Aeromonas hydrophila* foi de $7,87 \times 10^6$, $4,12 \times 10^6$ e $1,10 \times 10^6$ UFC/ml para *D. rerio*, *P. reticulata* e *X. helleri*, respectivamente. Para a espécie *Aeromonas aquariorum* os valores de LD₅₀ foram $3,03 \times 10^8$ UFC/ml para *D. rerio*, $1,56 \times 10^8$ UFC/ml para *P. reticulata* e $1,16 \times 10^8$ UFC para *X. helleri*.

A sintomatologia observada na infecção por *Aeromonas aquariorum* e *Aeromonas hydrophila* foi semelhante em todos os peixes que apresentaram inchaço da cavidade abdominal e zonas hemorrágicas nas brânquias.

De todos os antibióticos testados no ensaio *in vitro*, a Ciprofloxacina foi o único antibiótico com maior eficácia, quer para a *Aeromonas aquariorum*, quer para a *Aeromonas hydrophila*.

Podemos concluir que a dose ideal de anestésico MS-222 varia para as espécies *Danio rerio*, *Poecilia reticulata* e *Xiphophorus helleri*, onde apenas a dose de 125 mg/l é capaz de anestésiar eficazmente todas as referidas espécies.

Todos os peixes foram mais sensíveis à bactéria *Aeromonas hydrophila* quando comparada com *Aeromonas aquariorum*. A utilização de ciprofloxacina pode ser uma boa estratégia terapêutica para infecções provocadas por ambas as bactérias, principalmente porque não foi possível observar sintomatologias diferentes nas infecções provocadas nestes peixes por *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas aquariorum*.

Palavras-chave: *Aeromonas hydrophila*; *Aeromonas aquariorum*; Peixes ornamentais; Doenças bacterianas; Infecção experimental; MS-222

ABSTRACT

The aim of this work was to compare the sensitivity of three main freshwater ornamental fish species, *Danio rerio*, *Poecilia reticulata* and *Xiphophorus helleri*, to *Aeromonas hydrophila* (DSM 30016) and *Aeromonas aquariorum* (DSM 18362), two human zoonotic bacteria candidates.

In order to handling fishes during the infections induced by intraperitoneal injection we decided to define the optimum anesthetic dose (MS-222) for each fish species studied,. This was the second objective of this work.

The criterion defined for "optimal dose of anesthetic" was the dose that was able to induce the plane 4 of anesthesia until 180 seconds with a recovery phase lower than 300 seconds and full survival (100%) when the animals are submitted to a long exposure to the anesthetic (30 minutes). To define the MS-222 optimal dose we did several experiences with different MS-222 concentrations (75-250 mg/l) for the three fresh water species.

The bacteria sensitivity was performed by comparing the value of lethal dose that kills 50% of the fish (LD_{50}) in 48 hours after intraperitoneal injection with different bacteria densities. The optimum doses of MS-222 were 75, 100 and 125mg /l for *D. rerio*, 125, 150 and 200 mg / l for *P. reticulata* and 125 and 150 mg / l for the species *X. helleri*.

Aeromonas hydrophila was more virulent for all fish species when compared with *Aeromonas aquariorum*. The *Aeromonas hydrophila* LD_{50} were $7,87 \times 10^6$, $4,12 \times 10^6$ and $1,10 \times 10^6$ CFU/ml for *D. rerio*, *P. reticulata* and *X. helleri*, respectively. For *Aeromonas aquariorum* the LD_{50} were $3,03 \times 10^8$ CFU/ml to *D. rerio*, $1,56 \times 10^8$ CFU/ml to *P. reticulata* and $1,16 \times 10^8$ CFU/ml to *X. helleri*.

The symptoms observed in infection induced by *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas aquariorum* were similar for all fishes that showed abdominal cavity swelling and hemorrhagic areas in the gills.

The *in vitro* analysis to bacteria antibiotic sensitivity showed that both *Aeromonas aquariorum* and *Aeromonas hydrophila* had high sensitivity to Ciprofloxacin.

We can conclude that the optimal dose of the MS-222 anesthetic is species dependent and only the dose of 125 mg/l is able to effectively anesthetize the *Danio rerio*,

ABSTRACT

Poecilia reticulata and *Xiphophorus helleri*. All these species were more sensitive to *Aeromonas hydrophila* when compared with *Aeromonas aquariorum*. Ciprofloxacin can be a good therapeutic strategy for infections caused by both bacteria, mainly because it was not possible to observe differences in symptomatology induced by *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas aquariorum*.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*; *Aeromonas aquariorum*; Ornamental fish; Bacterial diseases; Experimental infection; MS-222

ÍNDICE

Resumo	v
Abstract.....	vii
Introdução.....	1
1.1 Caracterização das Espécies em Estudo.....	1
1.2 Agentes patogénicos no aquário.....	5
1.2.1 Género <i>Aeromonas</i> spp.....	6
1.2.2 <i>Aeromonas hydrophila</i> e <i>Aeromonas aquariorum</i>	7
1.3 Agentes terapêuticos contra bactérias patogénicas	8
1.4 Anestesia e bem estar animal.....	9
2 Objectivos.....	11
2.1 Objectivo geral.....	11
2.2 Objectivos específicos	11
3 Material e Métodos	13
3.1 Organismos Biológicos	13
3.2 Determinação da dose ideal de anestésico	13
3.3 Relação das unidades formadoras de colónias vs densidade óptica para <i>A. hydrophila</i> e <i>A. aquariorum</i>	14
3.4 Determinação da dose de LD ₅₀ para cada uma das bactérias	14
3.5 Identificação bioquímica de <i>A. hydrophila</i> e <i>A. aquariorum</i>	15
3.6 Determinação <i>in vitro</i> da eficácia de agentes terapêuticos, para <i>A. hydrophila</i> e <i>A. aquariorum</i>	15

3.7	Análise estatística.....	16
4	Resultados.....	17
4.1	Determinação da dose ideal de anestésico	17
4.2	Relação das unidades formadoras de colónias vs densidade óptica para <i>A. hydrophila</i> e <i>A. aquariorum</i>	20
4.3	Determinação do LD ₅₀ para cada uma das bactérias nas espécies <i>Danio rerio</i> , <i>Poecilia reticulata</i> e <i>Xiphophorus helleri</i>	21
4.4	Determinação <i>in vitro</i> da eficácia de agentes terapêuticos para <i>A. hydrophila</i> e <i>A. aquariorum</i>	27
5	Discussão e conclusão	29
6	Perspectivas futuras	35
7	Bibliografia.....	37

INTRODUÇÃO

A aquariofilia é um dos passatempos mais populares, tendo milhões de adeptos em todo o mundo (Livengood *et al.*, 2007), sendo considerada como o segundo *hobby* mais popular a nível mundial e o primeiro na categoria de animais de estimação (Oliver, 2001). Os primeiros registos da manutenção e cultura de peixes, com objectivos ornamentais, datam da antiga civilização egípcia, como objectos de relaxamento da mente. No entanto, a Aquariofilia como passatempo nasceu na realidade durante o século XIX, quando surgiu e foi desenvolvido o conceito de um aquário equilibrado, com plantas aquáticas e peixes. A Aquariofilia continuou a progredir e os aquários primitivos, tanques com peixes colhidos localmente em rios ou lagos, foram dando lugar a aquários comunitários, ostentando espécies exóticas de todo o mundo. Em pouco tempo este *hobby* converteu-se num desafio, não só à imaginação do público, como também à dos admiradores que se interessaram por manter aquários cada vez mais desafiantes (Pelicice & Agostinho, 2005). Por outro lado, a educação ambiental associada a grande aquários públicos ou privados, bem como a consciencialização de que algumas espécies são mais valiosas enquanto ornamentais do que como fonte de alimento, foram factores decisivos para o forte desenvolvimento do mercado associado aos peixes ornamentais.

Hoje em dia a produção de peixes ornamentais é uma parcela muito importante na indústria da aquacultura (Tlusty, 2002), gerando a comercialização de cerca de 350 milhões de peixes por ano, o que corresponde entre 800 milhões a 30 Biliões de Dólares US, onde cerca de 80 a 90% são espécies ornamentais de água doce (Helfman *et al.*, 2009).

1.1 Caracterização das Espécies em Estudo

Danio rerio (Hamilton, 1822)

O *Danio rerio*, conhecido como peixe zebra, pertencente à família dos ciprinídeos, ocorre naturalmente na Índia, Bangladesh, Nepal, Myanmar e Paquistão, numa grande variedade de habitats incluindo rios, canais de irrigação de campos de arroz e em lagoas (Daniels, 2002; Bhat, 2003).

São peixes ovíparos, espalhadores de ovos demersais, sem cuidados parentais. Exemplares desta espécie podem chegar aos 3,8 cm (Lawrence *et al.*, 2007), não

apresentando dimorfismo sexual, apenas em exemplares adultos e em fase de reprodução, é por vezes possível fazer a distinção entre machos e fêmeas, por estas apresentarem o abdómen mais alargado.

Taxonomia

Domínio: Eukarya

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Subfilo: Vertebrata

Superclasse: Gnathostomata

Classe: Actinopterygii

Infraclasse: Teleostei

Ordem: Cypriniformes

Família: Cyprinidae

Género: *Danio*

Espécie: *Danio rerio*

São uma das espécies ornamentais preferidas pelos aquarífilistas, sendo mantidos em aquários comunitários. Mas é na ciência que nas últimas décadas esta espécie ganhou especial importância, devido ao seu tamanho reduzido, rápido desenvolvimento, tempos de geração rápidos e semelhanças genéticas com humanos (Lamason *et al.*, 2005). O *Danio rerio* é utilizado como modelo vertebrado em estudos biomédicos, genéticos, de desenvolvimento, toxicidade e também para testar novas terapêuticas farmacológicas (Fishman, 2001; Sumanas & Lin, 2004).

As espécies *Poecilia reticulata* e *Xiphophorus helleri*, são comumente conhecidas como Guppies e Espadas, respectivamente. Estas são espécies de peixes ornamentais de água doce pertencem à família Poeciliidae, da qual fazem parte algumas das espécies ornamentais mais populares do mundo. São seres vivíparos, isto é, a fertilização ocorre no interior do corpo da fêmea, onde o embrião é mantido até à eclosão, e dióicos. Apresentam dimorfismo sexual e o macho possui uma modificação na barbatana anal, designada por

gonopódio. Este órgão é usado durante o processo de acasalamento para transferir o esperma para a fêmea de modo a ocorrer a fecundação. Esta característica distingue esta família da maioria das restantes famílias de peixes.

Poecilia reticulata (Peters, 1854)

Taxonomia

Domínio: Eukarya

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Subfilo: Vertebrata

Superclasse: Gnathostomata

Classe: Actinopterygii

Infraclasse: Teleostei

Ordem: Ciprinodontiformes

Família: Poeciliidae

Gênero: *Poecilia*

Espécie: *Poecilia reticulata*

Os Guppies possuem uma coloração bastante diversificada, com variados padrões de cores adquiridas devido a processos de selecção natural (Endler, 1980). Apresentam dimorfismo sexual, sendo os machos mais coloridos e com barbatana caudal maior do que as fêmeas. As fêmeas podem atingir 6,5 cm de comprimento (Reis *et al.*, 2003), enquanto os machos tem um comprimento médio de 2,8 cm, podendo chegar aos 3,5 cm. Os machos atingem a maturação aos 2 meses e as fêmeas aos 3 meses de idade (Reznick *et al.*, 2001).

É uma espécie nativa de zonas de água doce e salobra do continente Americano, desde os Estados Unidos até à Argentina (Reis *et al.*, 2003), estando presente em lagos, rios, nascentes de água quente e estuarinas com pH entre 7.0 e 8.0. Estes locais podem ser zonas com condições de água turva ou água translúcida, podendo estar localizados desde o nível do mar a grandes elevações montanhosas. Necessitam de água a uma temperatura

entre 23 e 28°C, tendo uma temperatura máxima letal de 32°C, já que a partir desta temperatura regista-se a degeneração das gónadas nas fêmeas, assim como a masculinização dos sobreviventes, surgindo uma grande mortalidade (Dzikowski *et al.*, 2001). O seu ciclo reprodutivo é influenciado pela temperatura da água, sendo a temperatura óptima entre 25-27°C, ocorrendo neste intervalo mais desovas num menor período de tempo.

Os Guppies são considerados omnívoros (Sakano & Iguchi, 2009), no ambiente natural o alimento preferencial são larvas de insectos presentes na coluna de água.

Xiphophorus helleri (Heckel, 1848)

Taxonomia

Domínio: Eukarya

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Subfilo: Vertebrata

Superclasse: Gnathostomata

Classe: Actinopterygii

Infraclasse: Teleostei

Ordem: Ciprinodontiformes

Família: Poeciliidae

Género: *Xiphophorus*

Espécie: *Xiphophorus helleri*

Os espadas para além do gonopódio possuem outra diferença morfológica entre sexos, o alongamento da parte inferior do raio da barbatana caudal de machos maduros, sendo esta a diferença que deu origem ao nome comum desta espécie (Tamaru *et al.*, 2001; Yang & Tiersch, 2009).

As fêmeas podem atingir cerca de 16 cm, enquanto que os machos, normalmente mais pequenos e mais coloridos, podem atingir 14 cm. A maturidade sexual ocorre entre a décima e a décima segunda semana, apresentando tamanhos entre 25 e 30 mm. A área de distribuição geográfica estende-se a partir do Norte do México até às partes centrais da América Central, Guatemala e Honduras (Tamaru *et al*, 2001). Necessitam de água a uma temperatura entre 22 e 28°C, com pH entre 7 a 8 (Wischmath, 1993).

1.2 Agentes patogénicos no aquário

Os agentes patogénicos de peixes são geralmente habitantes naturais do ambiente aquático, sendo que muitos destes agentes patogénicos ocorrem independentemente dos peixes ou, ainda que associados ao hospedeiro, não são capazes de provocar episódios de doença (Bernoth & Crane, 1995; Lewbart, 2001).

Um episódio de doença surge geralmente devido a uma conjugação de factores entre o ambiente aquático, o hospedeiro e o agente patogénico. Num estado de equilíbrio, o agente patogénico não consegue provocar um episódio patológico. No entanto, alterações ambientais negativas provocam geralmente alterações fisiológicas, comumente denominadas por situações de *stress* (Bernoth & Crane, 1995; Wildgoose, 2001). Nestas condições o sistema imunitário do peixe fica debilitado, permitindo uma proliferação do agente patogénico, desenvolvendo-se assim a patologia. Na realidade, os peixes são susceptíveis aos mesmos agentes patogénicos que afectam os animais de sangue quente, incluindo vírus, fungos, parasitas e bactérias (Noga, 2000).

Os vírus são patogénicos importantes nos ambientes aquáticos, no entanto devido à grande diversidade de espécies de peixes e às técnicas especializadas requeridas para a detecção e identificação deste grupo de agentes patogénicos, a maioria dos vírus que afectam os peixes não estão descritos (Buck, 2001; Palmero & Weber, 2010).

As infecções fúngicas em peixes estão frequentemente relacionadas com membros da família Saprolegniaceae, classe Oomycetes. As patologias associadas a fungos são geralmente secundárias, aparecendo devido a más condições de estabulação, nutrição deficiente, lesões físicas e doenças parasitárias ou bacterianas (Khoo, 2000; Hilliman, 2001). Geralmente afectam os peixes ao nível da pele, barbatanas e brânquias, sendo esta patologia na maioria dos casos de fácil detecção, tratamento e erradicação (Bassleer, 2001). Também nos peixes ornamentais estas patologias são frequentemente encontradas, no entanto, tal como referido anteriormente, o tratamento é, normalmente, fácil, se houver

cuidado na escolha do tratamento (Harms, 1996). Apesar de tudo, muitas vezes ocorre insucesso no tratamento de infecções parasitárias, que está relacionado com o aparecimento de infecções secundárias não detectadas, nomeadamente infecções bacterianas.

As infecções bacterianas são das patologias mais comuns em peixes ornamentais, podendo ser causadas por patogénicos primários ou secundários do tipo oportunista. Na maioria dos casos as infecções bacterianas são provocadas por espécies Gram negativas, especialmente bactérias dos géneros *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Flavobacterium* (*Flexibacter*), *Mycobacterium*, *Pseudomonas* e *Vibrio* (Lewbart, 2001).

As bactérias, são capazes de viver de forma independente do hospedeiro, estando naturalmente presentes no ambiente aquático. Deste modo, os peixes estão em constante interação com uma ampla gama de microrganismos patogénicos e não patogénicos. Tal situação permitiu o desenvolvimento de mecanismos de defesa complexos que permitem contribuir para a manutenção do seu estado sanitário (Subramanian *et al.*, 2007).

O género *Aeromonas* é um dos principais grupos que afectam uma grande variedade de peixes ornamentais de água doce e ocasionalmente espécies de água salgada (Martínez-Murcia *et al.*, 2008). Também por esta razão, estes microrganismos têm sofrido particular atenção pela comunidade científica e serão alvo de estudo neste trabalho.

1.2.1 Género *Aeromonas* spp.

Aeromonas são microrganismos classificados no domínio Bacteria, filo Proteobacteria, classe Gamaproteobacteria, ordem Aeromonadales, família Aeromonadaceae e género *Aeromonas* (Prescott, 2002). Os membros deste género encontram-se numa diversidade de *habitats*, incluindo ambiente terrestre e aquático, tendo emergido como importantes patogénicos em aquaculturas, bem como em humanos, sendo a água e os animais uma fonte potencial para a transmissão de *Aeromonas* spp. para humanos (Vivekanandhan *et al.*, 2002; Daskalov, 2006; Sierra *et al.*, 2010).

A primeira vez que *Aeromonas* foram consideradas como agente patogénico de humanos foi em 1954, após serem isoladas do sangue, pulmões, fígado, baço, urina, líquido cefalorraquidiano e músculo estriado de uma mulher imunodeprimida (Parker & Shaw, 2011). Desde então, inúmeros têm sido os casos relatados de infecções em humanos causadas por bactérias do género *Aeromonas*. A infecção está associada a doenças

gastrointestinais, nomeadamente em crianças, idosos e populações imunodeprimidas, que sofrem de doenças como o cancro e a diabetes (Radu *et al.*, 2003).

Actualmente existem cerca de 20 espécies de *Aeromonas* descritas: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas bestiarum*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas caviae* (sinónimo de *Aeromonas punctata*), *Aeromonas media*, *Aeromonas eucrenophila*, *Aeromona sobria*, *Aeromonas veronii* (sinónimo de *Aeromonas sichthiosmia* e *Aeromonas sculicicola*), *Aeromonas jandaei*, *Aeromonas schubertii*, *Aeromonas trota* (sinónimo de *Aeromonas enteropelogenes*), *Aeromonas allosaccharophila*, *Aeromonas encheleia*, *Aeromonas popoffii*, *Aeromonas simiae*, *Aeromonas molluscorum*, *Aeromonas bivalvium*, *Aeromonas aquariorum*, *Aeromonas tecta* e *Aeromonas piscicola* (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2009). Sendo que as últimas três foram descobertas apenas durante os últimos 3 anos, a *A. aquariorum* em 2008 (Martínez-Murcia *et al.*, 2008), a *A. tecta* em 2008 (Demarta *et al.*, 2008) e a *A. piscicola* em 2009 (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2009). As espécies *A. hydrophila*, *A. veronii*, *A. sobria*, *A. jandaei*, *A. schubertii* e *A. caviae* são as principais espécies responsáveis pela infecção em humanos, correspondendo a cerca de 85% das bactérias isoladas em pacientes infectados por espécies do género *Aeromonas* (Sen & Rodgers, 2004).

No que diz respeito à aquacultura o género *Aeromonas* é responsável por patologias como septicemia hemorrágica generalizada, apodrecimento das barbatanas, hidropisia abdominal e úlceras cutâneas (Jacobs & Chenia., 2007; Abolghait *et al.*, 2010).

1.2.2 *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas aquariorum*

A *Aeromonas hydrophila* é uma enterobactéria Gram-negativa, móvel, oportunista, sendo um bacilo amplamente distribuído nos ambientes aquáticos. Esta bactéria tem uma importância socioeconómica, devido à sua elevada patogenicidade para humanos e animais aquáticos, incluindo os peixes (Harikrishnan *et al.*, 2010)

No caso do Homem, existem imensos casos de incidência destas bactérias, sendo encontradas sobretudo no tracto digestivo provocando diarreias e gastroenterites (Altwegg *et al.*, 1999; Pitarangsi *et al.*, 1981). Podem ser também encontradas em queimaduras de pacientes que tiveram em contacto com águas não tratadas (WHO, 2008) e em dermatites agudas e crónicas (Noga, 2000).

Nos peixes, a *Aeromonas hydrophila*, pode infectar muitas espécies de aquacultura de água doce e salobra, sendo a espécie dentro do género com maior ocorrência, sobretudo em animais de água doce (Palmeiro, 2010). É caracterizada por provocar várias patologias

nos peixes, como deterioração de barbatanas e escamas e septicemias hemorrágicas. A septicemia hemorrágica é caracterizada pela presença de pequenas lesões à superfície, hemorragias locais, especialmente nas brânquias, úlceras, abscessos, e distensão abdominal. Internamente os peixes podem acumular líquido ascítico (Harikrishnan *et al.*, 2010), ter anemia e danos nos órgãos internos, especialmente no fígado e rim. Nalguns casos de paralisia em peixes, a infecção, atinge a espinal medula (Ferguson, 2006).

A espécie *Aeromonas aquariorum* foi descrita, pela primeira vez por Martinez-Murcia *et al.*, (2008) em 2008, durante a pesquisa de espécies do género de *Aeromonas* na água e na pele de peixes ornamentais importados para Portugal. Fíguas e colaboradores (2009), descreveu a importância da *A. aquariorum* a nível de infecções clínicas extra-intestinais. Esta espécie possui uma grande virulência tendo um papel importante no desenvolvimento de uma infecção.

Embora esta espécie tenha sido isolada em peixes ornamentais de água doce, não existem até a data dados sobre a virulência, sintomatologia e as possíveis espécies de peixes ornamentais susceptíveis a esta bactéria.

As bactérias *A. hydrophila* e *A. aquariorum* são duas espécies com mobilidade e que apresentam bastantes semelhanças bioquímicas. *A. aquariorum* é uma espécie que difere da *A. hydrophila* pelo facto de não utilizar o L-Lactato (Martínez-Murcia *et al.*, 2008). É com base neste teste que a diferenciação bioquímica entre ambas as espécies pode ser feita.

1.3 Agentes terapêuticos contra bactérias patogénicas

Durante largos anos a indústria da aquacultura utilizou antibióticos de largo espectro para prevenir e combater as doenças causadas por bactérias. Esta prática ambientalmente insustentável induziu a resistência em bactérias pelo processo de bioacumulação associado. Tal prática tem sido uma preocupação a nível mundial (Kümmerer, 2009).

Nos últimos anos procurou-se restringir o uso de antibióticos de largo espectro, promovendo práticas preventivas na aquacultura, de modo a minimizar os danos causados no ambiente. Uma das estratégias tem passado pelo desenvolvimento de práticas de profilaxia, como uso de probióticos, vacinas e imunoestimulantes, para diminuir o risco de aparecimento de patologias (Chiu *et al.*, 2010; Balcázar *et al.*, 2006). No entanto, no que diz respeito à aquacultura de peixes ornamentais ainda se sabe muito pouco relativamente à utilização de antibióticos, bem como à utilização de metodologias profiláticas, continuando a usar-se produtos de largo espectro como prevenção e tratamento de patologias.

1.4 Anestesia e bem estar animal

De acordo com a recomendação da Comissão Europeia n.º 2007/526/CE, relativa às directrizes sobre o alojamento e os cuidados a prestar aos animais utilizados para fins experimentais e científicos, os peixes devem ser retirados com uma rede do compartimento normal e anestesiados num compartimento mais pequeno antes da manipulação. Os peixes devem ser mantidos sob o efeito da anestesia durante um período de tempo tão curto quanto possível e ser colocados em água limpa arejada para a recuperação.

A manipulação dos peixes é geralmente um factor de *stress* para estes animais. Desta forma a utilização de um anestésico diminui o *stress* causado no peixe, diminuindo o risco de aparecimento de patologias, aumentando de igual modo o bem-estar animal.

Apesar da comercialização de milhares de espécies diferentes, de todas as formas e tamanhos, é surpreendente a pouca informação científica existente sobre o bem-estar, bem como das práticas veterinárias em peixes ornamentais (Saxby *et al.*, 2010)

São vários os anestésicos utilizados em peixes (Hamackova *et al.*, 2004). A eficácia depende do anestésico e para um mesmo anestésico a dose varia entre espécies. Peixes com diferentes idades, tamanhos e sexo podem responder de forma diferente a uma mesma concentração de anestésico. A eficácia da dosagem de anestésico pode igualmente variar com factores ambientais como pH, salinidade, oxigénio dissolvido e temperatura (Zahl *et al.*, 2009).

Uma vez que a dose de anestésico varia de espécie para espécie é conveniente estabelecer dosagens efectivas de um anestésico para cada espécie de peixe (King *et al.*, 2005). No que diz respeito a espécies ornamentais de água doce não existe informação bibliográfica sobre doses de anestésico recomendadas. Por tudo isto é fundamental aumentar o conhecimento nesta área do saber, bem como definir doses de anestésico para a utilização e manipulação dos animais ornamentais. Este foi também um dos objectivos deste nosso estudo.

2 OBJECTIVOS

2.1 Objectivo geral

A aquariofilia ornamental é um dos principais passatempos, tendo milhões de praticantes em todo mundo, no entanto existem alguns agentes patogénicos, que podem, para além de causar mortalidade e danos aos habitantes do aquário, serem vectores de infecção de doenças zoonóticas.

Desta forma o objectivo deste trabalho foi comparar a sensibilidade de três das principais espécies de peixes ornamentais de água doce, *Danio rerio*, *Poecilia reticulata* e *Xiphophorus helleri*, em duas bactérias potencialmente zoonóticas para o Homem, a *Aeromonas hydrophila* e a *Aeromonas aquariorum*.

2.2 Objectivos específicos

De modo a cumprir o objectivo deste estudo foi necessário realizar várias experiências ligadas a objectivos específicos:

1. Determinação da dose ideal do anestésico MS-222 para as três espécies de peixes ornamentais estudadas;
2. Determinação da relação das unidades formadoras de colónias vs densidade óptica para as bactérias em estudo;
3. Determinação da dose letal capaz de matar 50 % dos peixes (LD₅₀) para cada uma das bactérias nas três espécies de peixes em estudo;
4. Determinação *in vitro* da eficácia de agentes terapêuticos para a *A. hydrophila* e *A. aquariorum*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Organismos Biológicos

Ao longo deste ensaio experimental foram utilizados cerca de 300 *Danio rerio* ($0,47 \pm 0,05g$), 300 *Poecilia reticulata* ($0,72 \pm 0,07g$). e 300 *Xiphophorus helleri* ($1,34 \pm 0,33$). Os peixes foram obtidos por reprodução no laboratório de Aquacultura Ornamental da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar de Peniche.

As culturas puras das duas bactérias do género de *Aeromonas*, *Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila* (DSM 30016) e *Aeromonas aquariorum* (DSM 18362) foram adquiridas ao banco Alemão de microrganismos e células (DSMZ), e após hidratação, de acordo com as instruções do produto foram criopreservadas com glicerol em aliquotas a $-80^{\circ}C$ (Thermo, Electron Corporation).

3.2 Determinação da dose ideal de anestésico

Para a determinação da dose ideal de anestésico nas três espécies em estudo foi usado o agente anestésico MS-222 (Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA).

As doses de anestésico foram preparadas imediatamente antes do ensaio experimental. O MS-222 foi adicionado directamente aos tanques a diferentes concentrações (75, 100, 125, 150, 200 e 250 mg/l). Após a dissolução do anestésico na água do tanque, o pH foi medido e sempre que necessário foi adicionado bicarbonato de sódio de forma a aumentar o pH para valores próximos de 7.0. Considerou-se como dose ideal de anestésico a dose que provoca o plano 4 de anestesia num peixe em menos de 180 segundos, recuperação em menos de 300 segundos e 100% de sobrevivência após longa exposição ao anestésico (30 minutos) (Treves-Brown, 2000; Pawar, 2011). O plano 4 de anestesia corresponde à total perda de equilíbrio, com batimentos operculares rápidos mas regulares e reacção apenas a estímulos muito fortes. O tempo de recuperação é o tempo que um peixe anestesiado leva a recuperar o equilíbrio total a partir do momento que é colocado num tanque sem agente anestésico (Treves-Brown, 2000).

Para cada espécie foram utilizados oito peixes por concentração. Quatro dos peixes foram colocados individualmente na solução com anestésico até um período máximo de 180

segundos. Para cada peixe avaliou-se o equilíbrio, a reacção a estímulos, a mobilidade, o movimento opercular e sempre que um peixe atingiu o plano de anestesia 4 foi registado o tempo. Posteriormente os peixes foram colocados num tanque similar, mas sem anestésico com arejamento forte, registando-se o tempo que o indivíduo demorou a recuperar da anestesia. Os 4 peixes restantes permaneceram durante 30 minutos na solução anestésica, sendo depois retirados e colocados num tanque sem anestésico com arejamento forte, para avaliação da taxa de mortalidade quando sujeitos a longa exposição à dose de anestesia.

3.3 Relação das unidades formadoras de colónias vs densidade óptica para *A. hydrophila* e *A. aquariorum*

As culturas de bactérias *A. hydrophila* e *A. aquariorum* criopreservadas foram inoculadas em meio Tryptic Soya Agar (TSA), por espalhamento (100 µl). As placas foram posteriormente incubadas em estufa a 25°C durante 24 horas. Após o período de incubação de cada uma das culturas de bactérias foi recolhida uma porção de cultura, que foi colocada em tampão fosfato (PBS) de modo a preparar a solução “mãe” de cada uma das bactérias. A partir desta solução foram executadas em triplicado diluições decimais, e de cada uma delas recolhidos 100 µl para placas com TSA, efectuando-se o espalhamento. Estas foram posteriormente incubadas a 25°C, para obtenção do número de unidades formadoras de colónias (UFC/ml). Simultaneamente foi feita a medição em triplicado da densidade óptica a 600 nm (Helyus alpha, Thermo), obtendo-se assim a relação entre a densidade óptica e as UFC (Madigan *et al.*, 2004).

3.4 Determinação da dose de LD₅₀ para cada uma das bactérias

Para a determinação da dose letal de *A. hydrophila* e *A. aquariorum* cada uma das três espécies de peixe em estudo foi submetida a infecção com diluições decimais de cada uma das bactérias ($5,0 \times 10^9$ a $5,0 \times 10^4$ UFC/ml), através de injeção intraperitoneal de 100 µl de bactéria ou 100 µl de PBS no grupo de controlo.

Cada uma das bactérias utilizadas foi recuperada após injeção intraperitoneal em exemplares de *D. rerio*, de forma a proceder à activação biológica das mesmas. As bactérias recuperadas dos peixes foram devidamente identificadas através de testes bioquímicos, de forma a confirmar que a bactéria recuperada era a bactéria da infecção.

Após a recuperação, as culturas de bactérias foram incubadas a 25°C durante 24 horas. Posteriormente, de cada uma das culturas foi recolhida uma porção de cultura e colocada em PBS, sendo feita a leitura espectrofotometricamente para obtenção do número de UFC/ml. Sendo acertado as UFC/ml de cada uma das colónias para $5,0 \times 10^9$ UFC/ml para cada uma das bactérias. As restantes diluições foram realizadas a partir da suspensão anterior.

A injeção intraperitoneal foi realizada com uma seringa estéril de 1 ml (TERUMO; modelo MYJECTOR), individualmente, com o peixe devidamente anestesiado com a dose de MS-222 ideal para cada uma das espécies. Após a injeção os peixes foram colocados a recuperar no respectivo tanque de ensaio.

Para cada espécie de peixe/bactéria/diluição foram utilizados 6 indivíduos com 3 réplicas.

A mortalidade foi registada às 12, 24 e 48 horas após a infecção. Neste período os peixes mortos foram recolhidos e sujeitos a análise microbiológica através do inóculo de fígado e baço de cada um dos peixes em placas de TSA, incubadas a 25°C durante 24 horas. As bactérias recuperadas foram isoladas e identificadas com testes bioquímicos.

3.5 Identificação bioquímica de *A. hydrophila* e *A. aquariorum*

Para efectuar a identificação das colónias isoladas foram utilizadas as tabelas de identificação descritas por Buller (2004) até à identificação do género. Para diferenciação das espécies do género *Aeromonas*, foram utilizados os dados de Martínez-Murcia e colaboradores (2008). Deste modo foram utilizados os seguintes testes bioquímicos de identificação: Teste de Gram, morfologia, oxidase, mobilidade, oxidação/fermentação, crescimento em placa de TSA em 24 horas, sensibilidade a O/129, sensibilidade a Novobiocina, requerimento de sal, gás da glicose, pigmento castanho, lisina descarboxilase, ornitina descarboxilase, ácido L-arabinose, ácido D-Manitol, ácido sorbitol, ácido sacarose e utilização de L-lactato.

3.6 Determinação *in vitro* da eficácia de agentes terapêuticos, para *A. hydrophila* e *A. aquariorum*

A determinação da eficácia de agentes terapêuticos, para as espécies de bactérias em estudo, foi determinada *in vitro* pelo método de difusão em disco (antibiogramas) descrito

por Vandepitte e colaboradores (2003). Para tal realizou-se um espalhamento de cada uma das bactérias com o auxílio de uma zaragatoa estéril numa placa com meio Muller-Hinton. Os discos comerciais (Oxoid, Cambridge, Reino) contendo os antibióticos Flumequina (30 µg/disco), Norfloxacin (10 µg/disco), Cloranfenicol (30 µg/disco), Ciprofloxacina (5 µg/disco), Gentamicina (30 µg/disco), Ceftazidima (30 µg/disco), Amoxicilina (25 µg/disco), Ampicilina (10 µg/disco), foram transferidos com o auxílio de uma pinça estéril para as placas previamente semeadas

As placas foram incubadas a 25 °C durante 24 horas, procedendo-se no final da incubação à medição dos halos de inibição correspondentes a cada disco. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

3.7 Análise estatística

As regressões lineares foram usadas para estabelecer a comparação entre as doses de MS-222 (mg/L) e os tempos de anestesia e recuperação. A comparação dos valores da variação do tempo de anestesia e de recuperação e dos valores de LD₅₀ entre as diferentes espécies de peixes foram comparados através do teste de t-student. A comparação da actividade bacteriana foi feita através do teste “one-way ANOVA”, seguido do teste de comparações múltiplas Newman-Keuls. As diferenças estatisticamente significativas, foram avaliadas ao nível de 5.00%, representadas por $p < 0,05$. Todos os resultados foram processados e analisados com o software estatístico Graph Pad Prism 5 (San Diego, California, U.S.A).

4 RESULTADOS

4.1 Determinação da dose ideal de anestésico

O ensaio de anestesia realizado teve como objectivo determinar as doses ideais de anestésico MS-222 mg/L, capazes de induzir o plano de anestesia 4 nas três espécies de peixes ornamentais de água doce. Tal como foi referido anteriormente a dose ideal de anestesia foi considerada a dose que provoca o estágio de anestesia pretendido em menos de 180 segundos, um tempo de recuperação inferior a 300 segundos, e sobrevivência à exposição de longa duração (30 minutos). Em todas as espécies houve doses de anestésico incapazes de provocar o plano 4 de anestesia em menos de 180 segundos e doses que provocaram mortalidade após exposição de longa duração.

Os tempos de anestesia e recuperação, obtidos para cada espécie de acordo com as concentrações de anestésico, bem como a mortalidade registada, encontram-se representados na figura 1. É facilmente observável que a espécie *D. rerio* foi a que apresentou maior sensibilidade ao MS-222, necessitando de uma menor concentração de MS-222 (75 mg/L) para obter o estado de anestesia, segundo os critérios pré-definidos de uma boa dose de anestesia, sendo também a que apresenta mortalidade por longa exposição a uma concentração mais baixa (> 150 mg/L). A espécie *P. reticulata* foi a que apresentou uma maior resistência ao anestésico, necessitando de uma dose mínima de 125 mg/L, para se obter uma dose ideal de anestesia, tal como a espécie *X. helleri*. No entanto, esta última apresenta mortalidade por sobreexposição a partir dos 200 mg/L, enquanto que a espécie *P. reticulata*, apenas apresenta mortalidade a partir da concentração 250 mg/L.

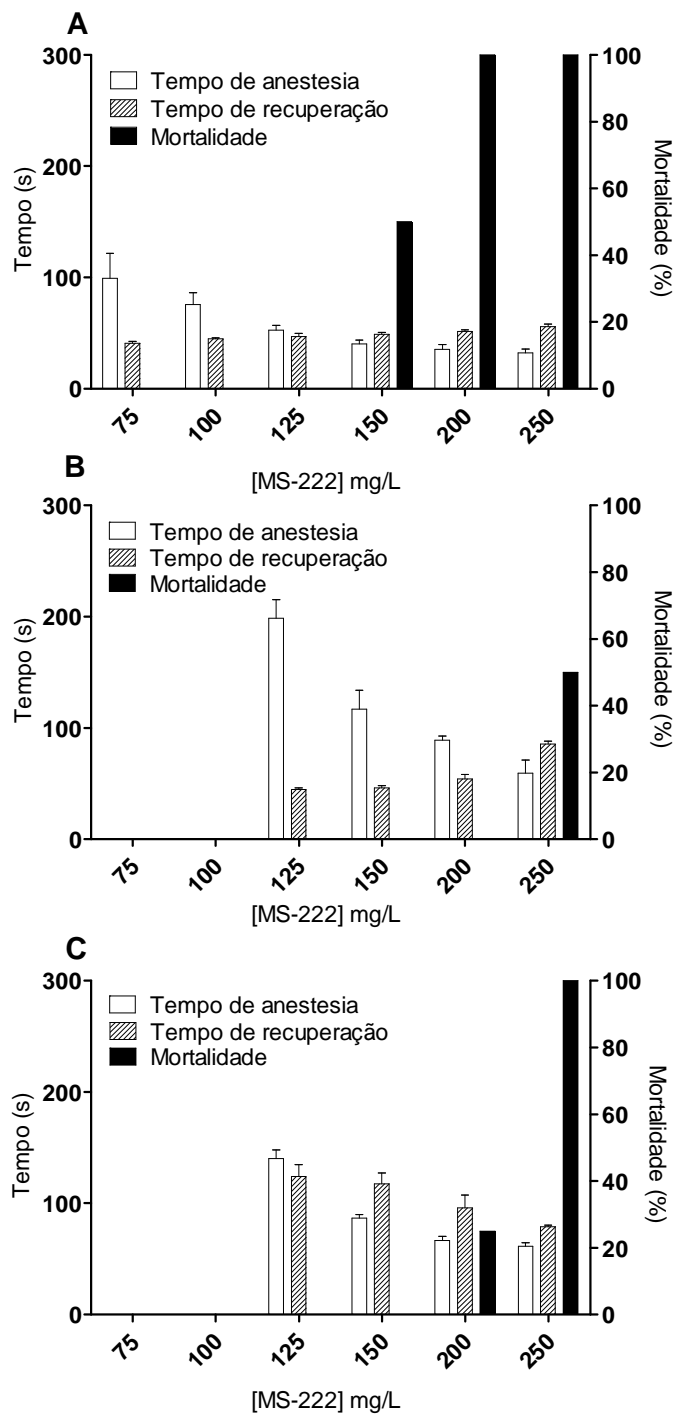


Figura 1 - Tempo médio de anestesia e recuperação (s) obtido nas diferentes doses de MS-222 para as espécies *Danio rerio* (A), *Poecilia reticulata* (B) e *Xiphophorus helleri* (C). Os valores correspondem à média \pm Erro padrão da média (SEM) (n=4).

Por forma a avaliar a dependência do tempo de anestesia e de recuperação em função da concentração de MS-222 foram elaboradas regressões lineares para todas as espécies. Da análise destes gráficos (resultados não apresentados) foi possível retirar as várias equações para a relação do tempo de anestesia com a concentração de MS-222 até ser atingido o plano 4 de anestesia: *D. rerio* - $Y = -0,3550x + 109,1$ ($R^2 = 0,764$); *P. reticulata* - $Y = -0,986x + 294,8$ ($R^2 = 0,831$); *X. helleri* - $Y = -0,555x + 189,4$ ($R^2 = 0,73$). Para a relação dos tempos de recuperação e a concentração de anestésico, as equações obtidas foram: *D. rerio* - $Y = 0,0782x + 36,43$ ($R^2 = 0,973$); *P. reticulata* - $Y = 0,319x - 0,191$ ($R^2 = 0,861$); *X. helleri* - $Y = -0,371x + 171,3$ ($R^2 = 0,995$). A variação dos referidos tempos, de recuperação e de anestesia, com a concentração de anestésico encontra-se esquematizada na tabela I. É possível verificar que os tempos de anestesia diminuem em função do aumento da dose de anestésico para todas as espécies. Este efeito foi mais acentuado para espécie *P. reticulata* quando comparada com as outras espécies. Nesta espécie por cada mg/L de MS-222 adicionada implica uma redução do tempo de anestesia de, aproximadamente, 1 segundo. Entre as espécies *D. rerio* e *X. helleri* não existem diferenças. Os tempos de recuperação tendem a aumentar para *D. rerio* e *P. reticulata* em função da concentração. Contrariamente, para a espécie *X. helleri* verifica-se uma diminuição do tempo de recuperação com o aumento da concentração de MS-222. A variação do tempo de recuperação revelou diferenças entre todas as espécies.

Tabela I - Valores da variação do tempo de anestesia e de recuperação (s) obtidos em função da concentração de anestésico MS-222 nas três espécies em estudo. Os valores correspondem média \pm Erro padrão da média (SEM)

Espécie	Δ do tempo de anestesia (s)/ mg.l de MS-222	Δ do tempo de recuperação (s)/ mg.l de MS-222
<i>Danio rerio</i>	-0.3550 ± 0.09867	0.07824 ± 0.006546
<i>Poecilia reticulata</i>	-0.9859 ± 0.3145	0.3190 ± 0.09059
<i>Xiphophorus helleri</i>	-0.5554 ± 0.2387	-0.3705 ± 0.01754

Assim as doses óptimas de MS-222 para provocar o estado 4 de anestesia segundo os critérios pré-definidos, para cada uma das espécies foram, 75, 100 e 125mg/L para *D. rerio*, 125, 150 e 200 mg/L para *P. reticulata* e 125 e 150 mg/L para a espécie *X. helleri*. Para as três espécies, 125 mg/L é a única concentração ideal que pode ser usada numa anestesia conjunta destas espécies.

4.2 Relação das unidades formadoras de colónias vs densidade óptica para *A. hydrophila* e *A. aquariorum*

A determinação das curvas que relacionam densidade óptica, realizada através de leituras espectrofotométricas a 600 nm de diluições decimais, com os valores de UFC/ml obtidos após espalhamento e incubação em TSA de cada uma das diluições para as diferentes bactérias, encontram-se representadas na figura 2. Para ambas as bactérias existiu uma relação linear entre a densidade óptica e as UFC/ traduzidas pelas equações: $y=1*109x+0,018$ e $y=1*1010x- 0,039$, para *A. hydrophila* e para *A. aquariorum*, respectivamente.

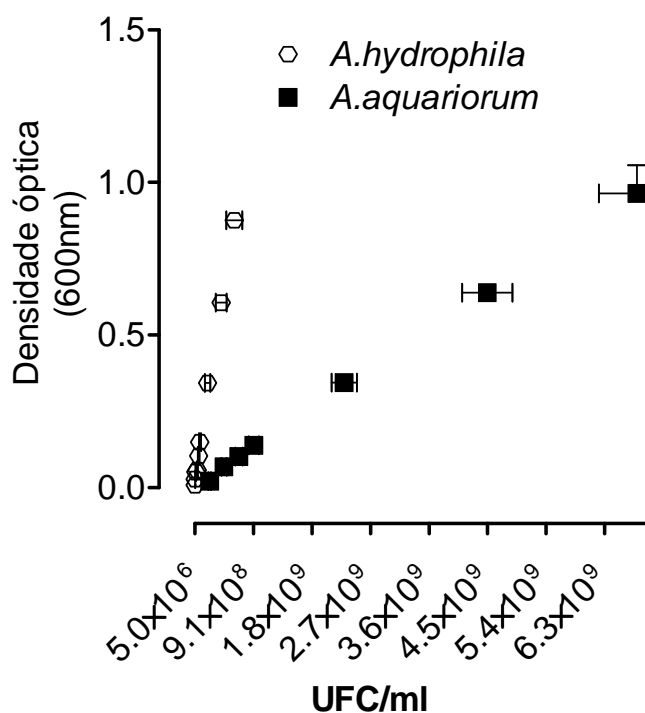


Figura 2 - Relação da densidade óptica de cada uma das bactérias a 600 nm (n=3) com o número de unidades formadoras de colónias (UFC/ml) (n=3). Os valores correspondem à média \pm Erro padrão da média (SEM).

Os resultados obtidos mostram que a bactéria *A. aquariorum* tem uma densidade celular muito superior à *A. hydrophila* para o mesmo valor de absorvância. Este resultado mostrou-se crucial, já que se utilizássemos a escala de UCF vs densidade óptica previamente definida, como é o exemplo da escala de Mc Farland, estaríamos a incluir um erro enorme nos nossos ensaios de virulência das referidas bactérias.

4.3 Determinação do LD₅₀ para cada uma das bactérias nas espécies *Danio rerio*, *Poecilia reticulata* e *Xiphophorus helleri*

Para determinar a dose de *A. hydrophila* e *A. aquariorum* capaz de matar 50% dos peixes de cada uma das espécies, foi realizado um estudo prévio, onde 6 exemplares de cada espécie foram colocados num banho com duas concentrações de cada uma das bactérias, $1,0 \times 10^7$ e $1,0 \times 10^8$, durante cerca de 21 dias, ao fim do qual não se verificou qualquer mortalidade (resultados não apresentados).

Dado que a infecção através de banho de imersão não se revelou eficaz, o ensaio de LD₅₀ foi realizado a partir da injeção intraperitoneal de 100 µl de cada uma das densidades de bactéria.

Logo nas primeiras horas, após a infecção, começaram a ocorrer alterações comportamentais dos peixes infectados e, conseqüentemente, mortalidade. Em todos os casos os peixes começaram por uma diminuição da actividade natatória, passando posteriormente pela perda de equilíbrio, encontrando-se no fundo ou na superfície a boiar: Passadas algumas horas após a sintomatologia descrita, os peixes acabaram por morrer.

A sintomatologia física dos peixes infectados com *A. hydrophila* e *A. aquariorum* (figura 3) foi semelhante para as espécies *D. rerio* e *P. reticulata*. Os peixes moribundos apresentavam inchaço da cavidade abdominal, com zonas hemorrágicas nas brânquias e no caso da infecção de *A. hydrophila*, o abdómen dos peixes apresentavam hemorragias internas de grande intensidade. Este último aspecto não foi verificado para os peixes infectados com *A. aquariorum*. No caso da espécie *X. helleri*, a sintomatologia não foi tão evidente em relação às restantes espécies, apresentando em geral apenas hemorragias branquiais. Os grupos controlo nunca apresentaram qualquer sintomatologia comportamental ou física.



Figura 3 – Sintomatologia externa após a infecção intraperitoneal em *Danio rerio* (A₁, A₂ e A₃), *Poecilia reticulata* (B₁, B₂ e B₃) e *Xiphophorus helleri* (C₁, C₂ e C₃), injectados respectivamente com PBS (X₁), *Aeromonas hydrophila* (X₂) e *Aeromonas aquariorum* (X₃).

De forma a avaliar a sensibilidade de cada espécie de peixe para as bactérias em estudo, foi traçado o perfil de dose resposta às 48 horas após infecção (figura 4). Para as duas bactérias, para todas as espécies estudadas, verificou-se um efeito depende das UFC/ml. Esta análise dose-resposta permitiu obter o valor de LD₅₀ para cada espécie de peixe vs bactéria (tabela II). Pela análise da tabela verifica-se que *A. hydrophila* necessita de menor concentração de UFC/ml do que *A. aquariorum* para reduzir em 50% a sobrevivência dos peixes em todas as espécies. Comparando os valores entre espécies, *X. helleri* é a espécie mais sensível para *A. hydrophila*, enquanto que, *D. rerio* e *P. reticulata* são as espécie mais resistentes, necessitando de uma concentração superior de UFC/ml para causar 50% da mortalidade. Para *A. aquariorum* não existem diferenças estatisticamente significativas relativamente à sensibilidade de todas as espécies de peixe em estudo.

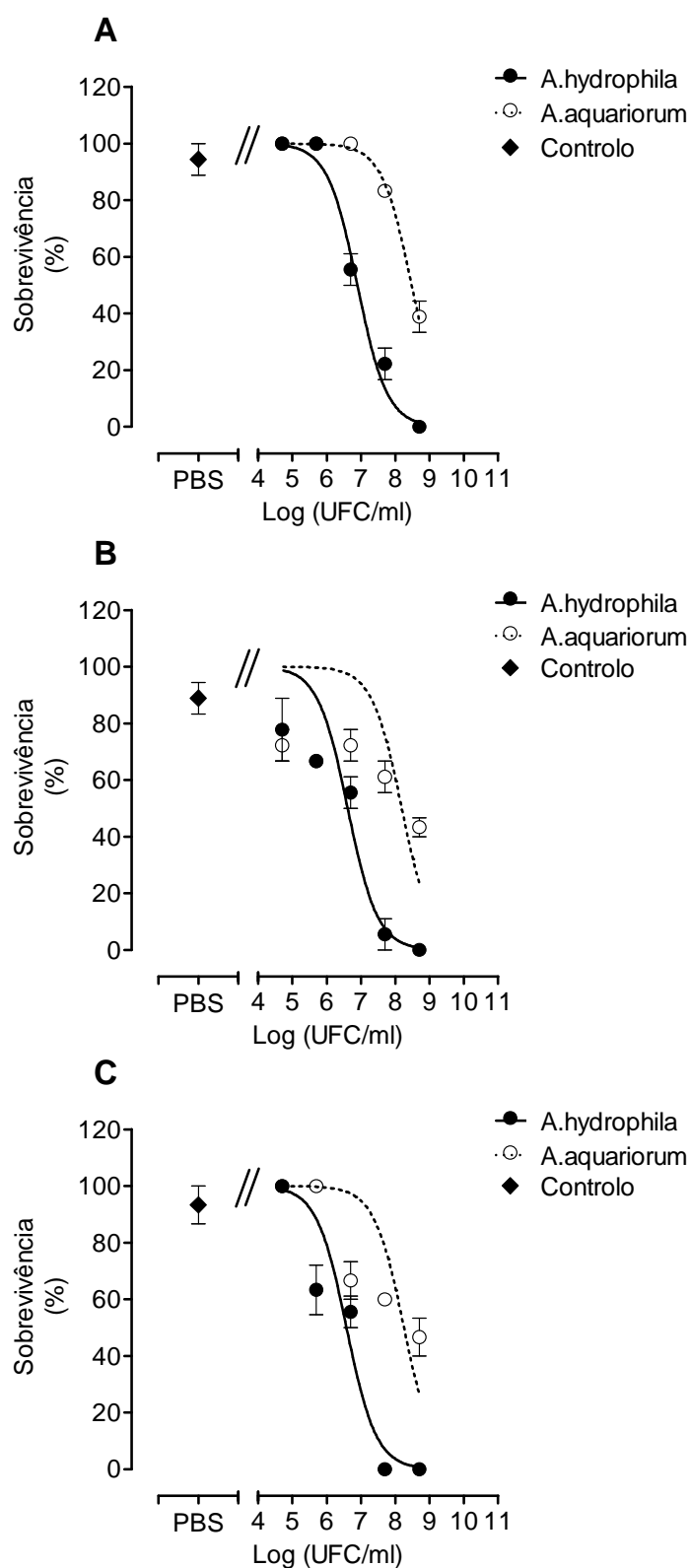


Figura 4 - Curva de sobrevivência (%) para *Danio rerio* (A), *Poecilia reticulata* (B) e *Xiphophorus helleri* (C) 48 horas após injeção intraperitoneal de diferentes UFC de *A. hydrophila* e *A. aquariorum*. Os valores correspondem à média \pm Erro padrão da média (SEM) (n=6).

Tabela II - Valor de LD₅₀ (UFC/ml) com intervalo de confiança 95%, obtidos para cada uma das espécies de peixes injectadas com *A. hydrophila* e *A. aquariorum* às 48 horas após injeção. Os valores correspondem à média (n=6).

	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. aquariorum</i>
<i>Dano rerio</i>	7,870e+006 (6.746 to 7.046)	3,027e+008 (8.401 to 8.561)
<i>Poecilia reticulata</i>	4,119e+006 (6.273 to 6.957)	1,561e+008 (7.645 to 8.741)
<i>Xiphophorus helleri</i>	1,103e+006 (5.717 to 6.369)	1,160e+008 (7.700 to 8.429)

Em todas as espécies houve pelo menos uma dose de *A. hydrophila* que provocou a totalidade da mortalidade às 48 horas. Pelo contrário, para a *A. aquariorum* nenhuma das doses testadas foi capaz de provocar mortalidade total em todas as espécies de peixes.

A avaliação da mortalidade ao longo do tempo (12, 24 e 48 horas) foi registada com o intuito de verificar de que forma cada uma das bactérias causa mortalidade nos peixes. Na figura 5, verifica-se que a mortalidade em *D. rerio* infectado com *A. hydrophila* às 12 horas é semelhante à verificada às 48h, ou seja a mortalidade parece ocorrer numa fase inicial até às 12h. Para as restantes espécies de peixe, a mortalidade vai, de um modo geral, aumentando ao longo do tempo, com excepção para a dosagem mais elevada de bactéria, 5 x 10⁸. Analisando a mortalidade ocorrida na infecção com *A. aquariorum* (figura 6), verifica-se na espécie *X. helleri* uma mortalidade independente do tempo, com a mortalidade às 12 horas a ser muito semelhante à mortalidade registada às 48 horas. Para as espécies *D. rerio* e *P. reticulata*, existe um aumento da mortalidade dependente do tempo estudado.

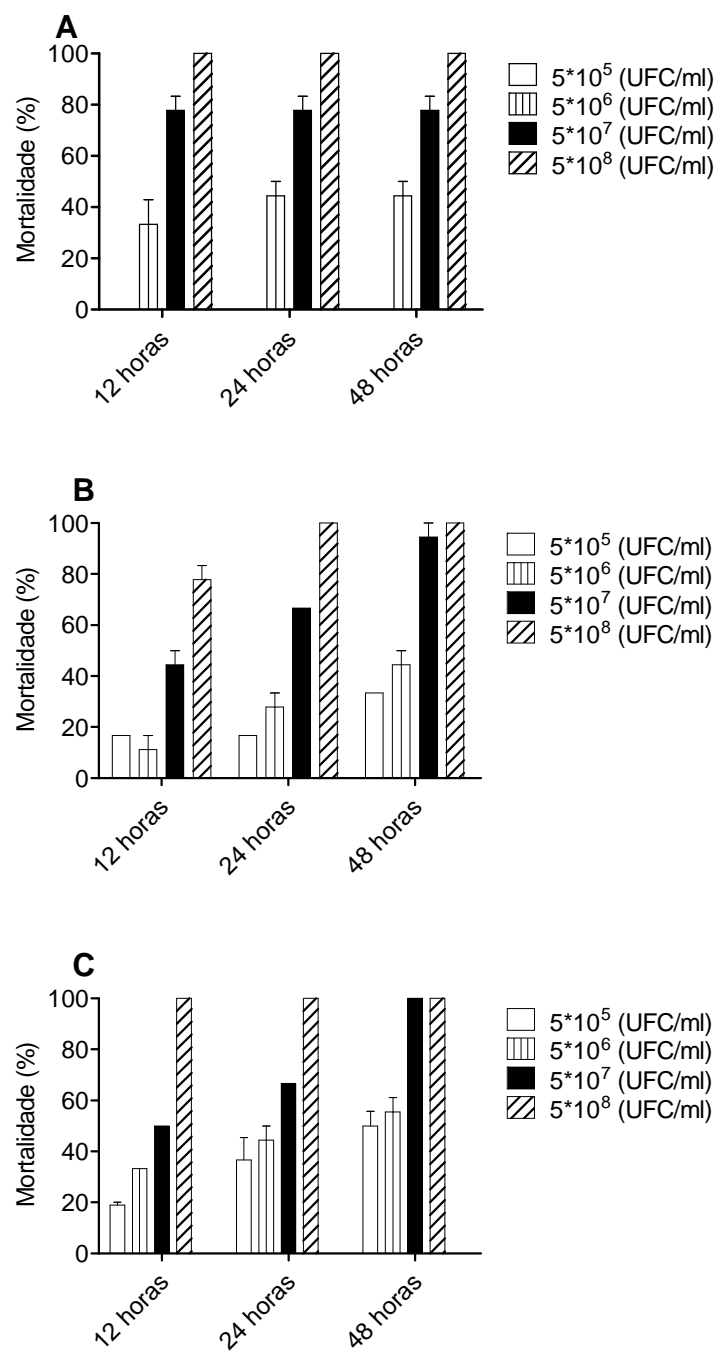


Figura 5 - Mortalidade (%) registada para as espécies *Danio rerio* (A), *Poecilia reticulata* (B) e *Xiphophorus helleri* (C) ao longo do tempo (12, 24 e 48 horas) após a infecção, com diferentes UFC de *A. hydrophila* A). Os valores correspondem à média \pm Erro de três experiências independentes com 6 peixes.

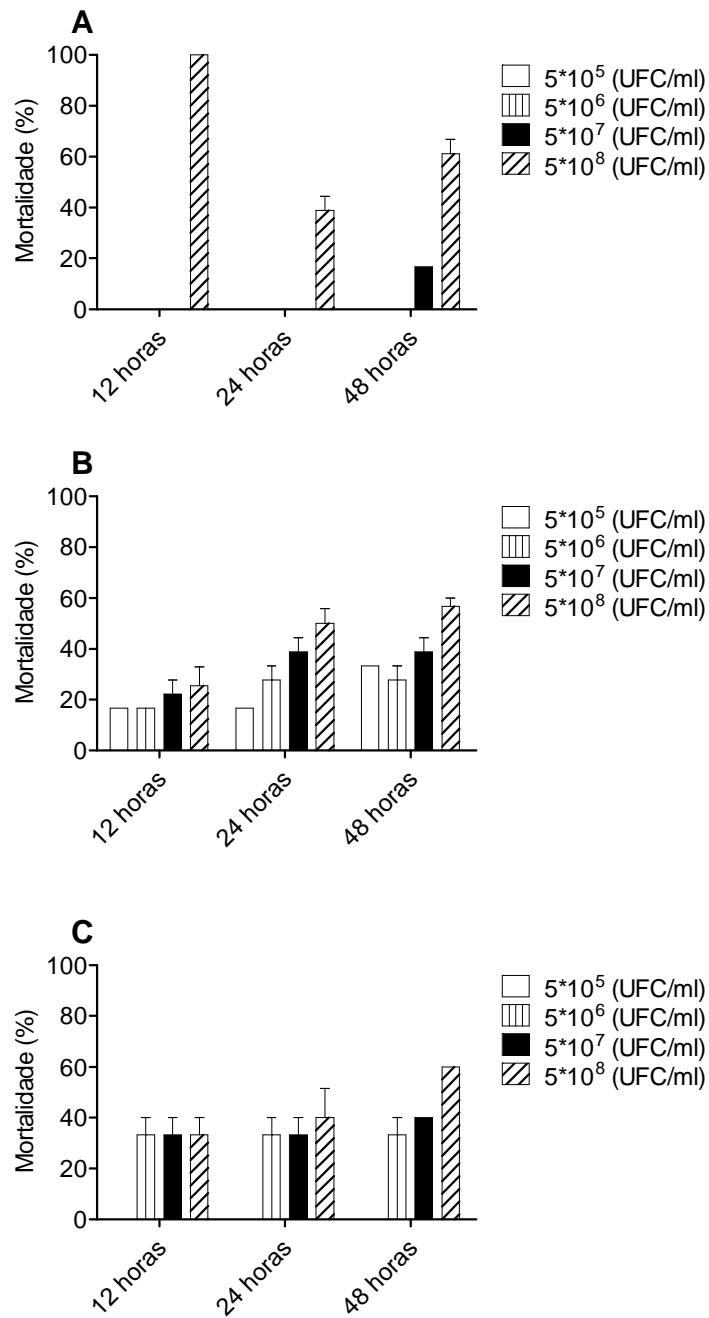


Figura 6- Mortalidade (%) registrada para as espécies *Danio rerio* (A), *Poecilia reticulata* (B) e *Xiphophorus helleri* (C) ao longo do tempo (12, 24 e 48 horas) após a infecção, com diferentes UFC de *A. aquariorum* A). Os valores correspondem à média ± Erro de três experiências independentes com 6 peixes.

4.4 Determinação *in vitro* da eficácia de agentes terapêuticos para *A. hydrophila* e *A. aquariorum*

Tal como foi já referido, a utilização de agentes antibióticos específicos para cada agente patogénico, ao invés da utilização de agentes terapêuticos de largo espectro, é de fundamental importância. Deste modo, neste estudo foram testados, *in vitro*, alguns antibióticos para perceber a sensibilidade e/ou resistência das bactérias *A. hydrophila* e *A. aquariorum* aos antibióticos Flumequina, Norfloxacin, Cloranfenicol, Ciprofloxacina, Gentamicina, Ceftazidima, Amoxicilina e Ampicilina (figura 7).

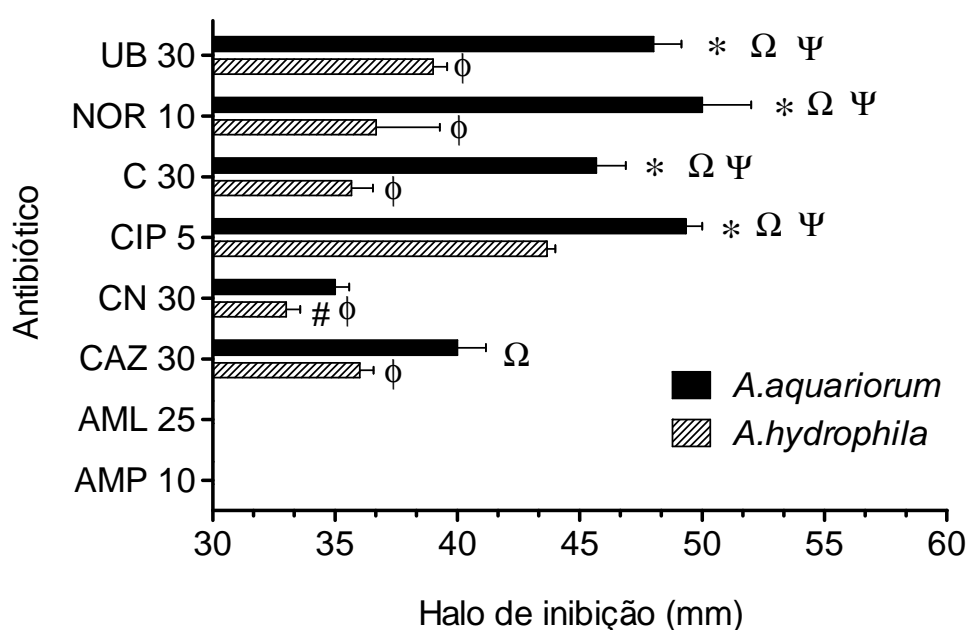


Figura 7- Avaliação da capacidade antibacteriana contra *A. hydrophila* e *A. aquariorum*. Os valores correspondem à média dos triplicados \pm Erro médio padrão (n=6). UB) Flumequina 30 μ g/disco; NOR) Norfloxacin 10 μ g/disco; C) Cloranfenicol 30 μ g/disco; CIP) Ciprofloxacina 5 μ g/disco; CN) Gentamicina 30 μ g/disco; CAZ) Ceftazidima 30 μ g/disco; AML) Amoxicilina 25 μ g/disco; Ampicilina 10 μ g/disco. * $p < 0,05$ representa diferenças estatisticamente significativas entre *A. hydrophila* e *A. aquariorum*. Φ $p < 0,05$ representa diferenças entre todos os antibióticos e CIP 5 para *A. hydrophila*. # $p < 0,05$ representa diferenças entre CN30 e UB30 para *A. hydrophila*. Ω $p < 0,05$ representa diferenças entre CN30 e todos os antibióticos para *A. aquariorum*. Ψ $p < 0,05$ representa diferenças entre CAZ 30 e todos antibióticos para *A. aquariorum*.

Tal como se pode verificar pela análise da figura 7, a Amoxicilina (25 μ g/disco) e Ampicilina (10 μ g/disco) não apresentaram actividade inibitória contra ambas as espécies de bactérias. Todos os restantes antibióticos testados apresentaram inibição do crescimento bacteriano. No entanto, a sensibilidade aos antibióticos Flumequina (30 μ g/disco), Norfloxacin (10 μ g/disco), Cloranfenicol (30 μ g/disco) e Ciprofloxacina (5 μ g/disco) foi

superior nas bactérias *A. aquariorum*. Por outro lado, verifica-se que o antibiótico com mais eficácia no caso da *A. hydrophila* é a Ciprofloxacina (5 µg/disco). No entanto, para a *A. aquariorum* os antibióticos Flumequina (30 µg/disco), Norfloxacin (10 µg/disco), Clorofenicol (30 µg/disco) e Ciprofloxacina (5 µg/disco) tiveram efeitos inibitórios elevados, mas semelhantes. O antibiótico Genetamicina (30 µg/disco) foi o que apresentou menor actividade para ambas as bactérias em estudo.

5 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O transporte de peixes ornamentais tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, estimando-se a comercialização de mais de 300 milhões de peixes por ano. Tal como foi referido anteriormente, a grande maioria das espécies comercializadas são espécies de água doce (80-90%) (Helfman *et al.*, 2009; Tlusty, 2002). Por esta razão, mas também porque têm aumentado o número de grandes aquários públicos e privados e porque algumas destas espécies são modelos animais utilizados em projectos de investigação e desenvolvimento, é fundamental reduzir o *stress* associado a uma variedade de actividades, que vão desde manipulações de rotina até operações cirúrgicas delicadas, garantindo o bem-estar animal. Para que isto seja possível a utilização de anestésicos é essencial, no entanto a aplicação destes agentes deve ser feita com precaução e em concentrações adequadas em função da espécie a anestésiar (Massei *et al.*, 1995; Weber *et al.*, 2009).

Uma variedade de agentes com propriedades diferentes podem ser usados para anestésiar peixes (Hamackova *et al.* 2004; Zahl *et al.*, 2009; Tsantilas *et al.*, 2006). O MS-222 é um dos principais agentes anestésicos usados em peixes (Velisek *et al.*, 2011), sendo particularmente eficaz em peixes pelo facto de ser altamente solúvel e de atravessar facilmente a membrana branquial (Hunn & Allen 1974; Treves-Brown 2000). Por tudo isto, nos últimos anos muita atenção tem sido dada ao uso de anestésicos em aquacultura, com o estabelecimento de doses óptimas para várias espécies. No entanto, não existem dados sobre as doses de MS-222 recomendadas para as espécies *D. rerio*, *P. reticulata* e *X. helleri*, que são das mais populares em aquariofilia. Neste trabalho, o MS-222 revelou-se eficaz na anestesia das espécies ornamentais de água doce estudadas. No entanto, as doses óptimas obtidas variaram entre espécies: *D. rerio* - 75, 100 e 125mg/L; *P. reticulata* - 125, 150 e 200 mg/L; *X. helleri* - 125 e 150 mg/L. Estes resultados revelam que a dose ideal de anestésico varia em função da espécie, facto que se encontra de acordo com os resultados obtidos por outros autores (Zahl *et al.*, 2009; King *et al.*, 2005). Verifica-se pelos resultados obtidos que a dose 125 mg/l pode ser utilizada nas três espécies em estudo, apesar destas apresentarem pesos bastante diferentes. Por outro lado, a dose de 200 mg/l pode ser utilizada na espécie *P. reticulata*, apesar de provocar mortalidade elevada nas outras espécies.

Em todas as espécies o tempo de anestesia, até atingir o plano 4, diminui com o aumento da dose de anestésico. Esta relação também foi observada em trabalhos anteriores realizados com outras espécies de peixe e com outros agentes anestésicos (Gullian & Villanueva, 2009; Weber *et al.*, 2009; Heo & Shin, 2010; Pawar, 2011). Por outro

lado, a variação do tempo de recuperação com a dose de anestésico, não foi idêntica nas três espécies. Para as espécies *D. rerio* e *P. reticulata*, o tempo de recuperação aumenta com o aumento da dose. Pelo contrário, nas espécies *X. helleri* verificou-se que o tempo de recuperação diminui com o aumento da dose. Esta situação, aparentemente estranha e contraditória foi já observada na anestesia de peixes ósseos (Mylonas *et al.*, (2005); Hseu *et al.*, (1998). A explicação para estas variações podem estar relacionadas, com o facto de, com o aumento da dose de anestésico o tempo de contacto do peixe com o anestésico na água vai diminuir, havendo uma assimilação de MS-222 menor. Deste modo, quando o peixe é colocado em recuperação, o anestésico é mais rapidamente eliminado da corrente sanguínea, o que permite uma recuperação mais rápida (Weber *et al*, 2009). No entanto, para além desta situação, as características moleculares dos próprios anestésicos, bem como as características fisiológicas e metabólicas das diferentes espécies vão, certamente, influenciar o tempo de recuperação após anestesia. Por exemplo, Woody e colaboradores (2002) e Gullian & Villanueva (2009), verificaram que o tempo de recuperação aumentou com a dose de anestésico, enquanto que Mylonas e colaboradores (2005) e Hseu e colaboradores (1998), mostraram uma diminuição do tempo de recuperação com o aumento da dose de anestésico.

Com os resultados obtidos no nosso trabalho, confirma-se a importância de determinar a dose ideal de anestésico em cada uma das espécies de peixes, de forma a garantir a saúde e bem-estar animal dos espécimes utilizados em trabalhos laboratoriais, não se podendo extrapolar doses de anestésico de espécie para espécie, por mais semelhantes que estas sejam.

Neste trabalho utilizaram-se as espécies *D. rerio*, *P. reticulata* e *X. helleri*, por serem três das principais espécies utilizadas na aquarioria ornamental de água doce e *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas aquariorum*, pertencentes à microfauna natural de um aquário, por serem bactérias potencialmente zoonóticas para o Homem.

D. rerio, *P. reticulata* e *X. helleri*, não demonstraram ser sensíveis à infecção, através de banho imersão, para nenhuma das espécies de bactérias em estudo. Resultados semelhantes foram obtidos por Pressley e colaboradores (2005), Rodríguez e colaboradores (2008) e Neely e colaboradores (2002), não tendo obtido mortalidades ao infectar zebras adultos através de banho de imersão de *Edwardsiella tarda*, *A. hydrophila*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus pyogenes*.

Pelo contrário, a infecção intraperitoneal demonstrou que todas as espécies de peixe em estudo são sensíveis às bactérias testadas. Estes resultados mostram que as defesas

naturais dos peixes desempenham um papel importante na manutenção do estado de saúde dos peixes. Na realidade, os peixes em condições naturais, livres de *stress* possuem mecanismos de defesa não específicos que são responsáveis pela primeira linha de defesa contra agentes patogénicos, impedindo que os agentes patogénicos presentes na água os invadam e causem patologia (Plouffe *et al.*, 2005; Magnadóttir, 2006; Rieger & Barreda, 2011).

A sintomatologia comportamental e física, observada no nosso trabalho após infecção, foi semelhante à descrita por outros autores em peixes infectados com *A. hydrophila*, em diferentes espécies de peixes, nomeadamente em *Clarias batrachus*, *Rhamdia quelen* e *Danio rerio* (Boijink & Brandão (2001); Majumdar *et al.*, (2001); (L, Rodríguez *et al.*, (2008)). A deterioração de barbatanas e escamas e a presença de úlceras cutâneas, apesar de não detectas neste estudo, são duas características comuns em peixes infectados naturalmente com bactérias do género *Aeromonas* (Abd-El-Rhman, 2009; Harikrishnan *et al.*, 2010; Poobalan *et al.*, 2010). A ausência destas sintomatologia, pode ser explicada pelo método de infecção utilizado, já que uma infecção no meio natural a bactéria vai-se desenvolvendo no hospedeiro gradualmente. Deste modo, à medida que a infecção aumenta, aumentam os sinais clínicos de deterioração de tecidos. Contrariamente, as infecções laboratoriais por injeção intraperitoneal estão associadas à introdução de grandes quantidades de unidades formadoras de colónias de uma forma instantânea, provocando muitas vezes mortalidade, sem que ocorra o desenvolvimento de todas as “marcas” sintomatológicas da infecção.

Apesar da sintomatologia ser fundamental para a avaliação e identificação de muitas patologias, o facto de não se verificarem diferenças na sintomatologia entre os diferentes peixes e diferentes bactérias, não permite, neste caso, associar uma sintomatologia específica entre agente patogénico e hospedeiro.

De acordo com os valores de LD₅₀ obtidos, *A. hydrophila* é mais virulenta para *D. rerio*, *P. reticulata* e *X. helleri*, do que *A. aquariorum*. Apesar de não existirem outros estudos sobre a virulência de *A. aquariorum*, Fígueras e colaboradores (2009), descreveram esta nova espécie de *Aeromonas* como sendo potencialmente virulenta para o homem, devido a possuir uma grande quantidade de genes virulentos. Por outro lado, não é surpreendente que a *A. hydrophila* tenha apresentado resultados mais nefastos para as espécies utilizadas, já que a sua virulência está geralmente associada à produção de toxinas extracelulares e enzimas bastante tóxicas (Allan & Stevenson, 1981). A fortalecer esta ideia, vários autores fazem referência à susceptibilidade destas espécies de peixe relativamente a *A. hydrophila* (Yin *et al.*, 1995; Sasmal *et al.*, 2004; Selvaraj *et al.*, 2005; Musa *et al.*, 2008; Pachanawan *et*

al., 2008). No entanto, embora existam estudos relativos à patogenicidade de *A. hydrophila* em peixes, a comparação dos nossos resultados com estes estudos é difícil, uma vez que a avaliação das mortalidades é muito distinta, indo desde a determinação da dose letal às 24 horas até às duas semanas (Boijink & Brandão, 21001, Pachawan *et al.*, 2008; Harikrishnan *et al.*, 2010). De um modo directo conseguimos apenas comparar os nossos resultados com o estudo realizado por Rodríguez e colaboradores (2008), em que obtiveram resultados semelhantes aos nossos para a espécie *D. rerio* infectada com *A. hydrophila*. No referido estudo foi observada uma mortalidade às 24 horas após infecção de cerca de 60% e 100 % em zebras infectados com 5×10^7 UFC/ml e 5×10^8 UFC/ml, respectivamente. No nosso estudo, para o mesmo tempo, verificaram-se mortalidade de *D. rerio*, após infecção com *A. hydrophila*, de 70 e 100%, para peixes infectados com 5×10^7 e 5×10^8 UFC/ml, respectivamente.

O período para ocorrer mortalidade foi distinto entre as várias espécies de peixes estudadas. O resultado mais curioso verificou-se para as espécies *D. rerio* e *X. helleri*, quando injectadas com *A. hydrophila* e *A. aquariorum*, respectivamente. Nestas situações verificou-se uma mortalidade muito grande nas primeiras 12 horas, não ocorrendo praticamente mais mortalidades nas restantes 36 horas. Tal situação pode estar relacionada com uma resposta imunitária do peixe sobre o agente patogénico, em que os indivíduos que conseguem sobreviver na fase inicial da infecção conseguem desenvolver, após o contacto com o agente patogénico, mecanismos de defesas específicos que vão combater a infecção.

Os valores de LD₅₀ determinados neste estudo são de extrema importância, na realização de trabalhos futuros, que permitam fazer associações entre agentes patogénicos e hospedeiros, bem como entre estes e agentes terapêuticos. Esta situação é ainda mais relevante se atentarmos ao facto destas espécies de bactérias serem potencialmente zoonóticas para o homem. No entanto, de modo a perceber a relação entre a especificidade de agente patogénico e hospedeiro, é necessário a elaboração de mais estudos, nomeadamente com outras espécies de peixes ornamentais.

A ampla utilização de antibióticos para tratar infecções bacterianas e a incorporação de doses preventivas destes agentes terapêuticos nas rações de produção animal, resultou num aumento global da resistência a antibióticos entre as bactérias patogénicas (Petersen & Dalsgaard, 2003; Hatha *et al.*, 2005). Assim, a redução da utilização de antibióticos de largo espectro e de antibióticos ineficazes ou inadequados é fundamental. A padronização e segurança dos medicamentos utilizados na aquicultura para a protecção do meio ambiente,

dos peixes e dos seres humanos, têm sido recentemente enfatizadas (Vaseeharan *et al.*, 2005).

Neste estudo testou-se a susceptibilidade de oito antibióticos comerciais, de forma a perceber quais os fármacos mais eficazes contra *A. hydrophila* e *A. aquariorum*.

Amoxicilina e ampicilina, pertencem ao grupo das penicilinas, no entanto diferem do antibiótico natural, Penicilina G, que não tem uma utilização regular em aquacultura. São dois antibióticos de grande uso em aquacultura, no entanto tem a sua actuação sobretudo em bactérias gram-positivas (Treves-Brown, 2000; Yanong, 2003). Neste estudo, estes antibióticos não apresentaram qualquer eficácia contra as *A. hydrophila* e *A. aquariorum*, bactérias Gram negativas. Estes resultados estão de acordo com o principal mecanismo de acção dos referidos antibióticos, bem como com estudos realizados por Hatha e colaboradores (2005) e Ottaviani e colaboradores (2005), que verificaram que 100% das estirpes do género *Aeromonas* são resistentes à ampicilina e amoxicilina.

A ciprofloxacina, pertencente ao grupo das fluoroquinolonas, é amplamente utilizada em medicina veterinária contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (Alvarez-Lorenzo *et al.*, 2006). Neste estudo, este foi o antibiótico que, *in vitro*, obteve maior sucesso na inibição do crescimento das duas bactérias em estudo. Resultados semelhantes foram obtidos por Akinbowale e colaboradores e Hatha e colaboradores (2005) obtendo 100% de sensibilidade em estirpes de *A. hydrophila*, para a ciprofloxacina. O autor Kampfer e colaboradores (1999), testou *in vitro* 69 agentes antimicrobianos, contra espécies do género *Aeromonas*, onde todas as estirpes demonstraram ser sensíveis ciprofloxacina.

Neste estudo *A. hydrophila* apresentou menor sensibilidade relativamente à espécie *A. aquariorum*, perante os antibióticos testados. Estes resultados não sendo conclusivos, podem ser indicativos de uma maior resistência de *A. hydrophila* contra os antibióticos estudados, resultado de uma ampla utilização dos mesmos.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste estudo foram utilizadas duas bactérias que ocorrem no aquário ornamental de água doce e que são potencialmente zoonóticas para o homem. Por esta razão é fundamental perceber qual a probabilidade deste *hobby* se tornar um elemento perigoso para a saúde e bem-estar do seu proprietário e se o risco existir, de que forma pode ser minimizado.

A compreensão da interacção específica entre bactéria e hospedeiro, de forma a perceber quais as espécies de peixe que uma bactéria afecta e qual a sintomatologia que produz, é essencial para criar métodos não evasivos na identificação e tratamento de patologias em peixes ornamentais. Neste estudo não foi possível detectar nenhum tipo de relação a este nível, neste sentido será pertinente realizar trabalhos futuros para tentar obter algumas destas respostas.

Neste trabalho não foram realizadas análises histológicas aos peixes infectados, de forma a verificar se internamente as bactérias afectam de igual modo todos os tecidos dos peixes. Igualmente pertinente, será perceber e se um peixe que consegue sobreviver à patologia, fica portador ou não da bactéria e de que forma poderá fazer a transmissão horizontal e/ou vertical do agente patogénico.

A utilização de imunoestimulantes, probióticos e vacinas é cada vez mais uma realidade em aquacultura, de forma a reduzir o número excessivo de antibióticos utilizados, cuja utilização massiva confere resistência por parte dos agentes patogénicos aos agentes terapêuticos. No entanto, em espécies ornamentais, existem poucos estudos que forneçam dados para começar a mudar o rumo da utilização indevida de antibióticos, como tal, torna-se também pertinente a realização de estudos que permitam avaliar a capacidade de alguns compostos na substituição de antibióticos comerciais.

7 BIBLIOGRAFIA

Abd-El-Rhman, A., 2009. Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology* 27, 454–459.

Abolghait, S., K., Akeda, Y., Kodama, T., Cantarelli, V., V., Iida, T., Honda, T., 2010. *Aeromonas hydrophila* PepO outer membrane endopeptidase activates human big endothelin-3 in vitro and induces skin ulcer in goldfish (*Carassius auratus*). *Veterinary Microbiology* 145, 113–121.

Allan, B., Stevenson, R., 1981. Extracellular virulence factors of *Aeromonas hydrophila* in fish infections. *Canadian Journal Microbiology* 27, 1114 - 1122.

Altwegg, M., Lucchini, G., M., Luthy-Hottenstein, J., Rohrbach, M., 1999. *Aeromonas* – associated gastroenteritis after consumption of contaminated shrimp. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 10 44-45

Balcázar, J., L., Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., Múzquiz, J., L., 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* 114, 173–186.

Beaz-Hidalgo, R., Alperib, A., Figueras, M., J., Romalde, J., L., 2009. *Aeromonas piscicola* sp. nov., isolated from diseased fish. *Systematic and Applied Microbiology* 32, 471–479.

Berno, E., M., Crane, M., J., 1995. *Viral Diseases of Aquarium Fish*. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 2, 103-110.

Bassler, G., 2003. *The New Illustrated Guide to Fish Diseases*. Hollywood Import & Export, Inc.

Bhat, A., 2003. Diversity and composition of freshwater fishes in streams of Central Western Ghats, India. *Environmental Biology of Fishes* 68, 25-38.

Boijink, C., L., Brandão, D., A., 2001. Inoculação bacteriana de *Aeromonas hydrophila* e a sobrevivência de juvenis de Jundia, *Rhamdia quelen* (Teleostei:Pimelodidae). *Ciência Rural, Santa Maria* 3, 503-507.

Buller, N., B., 2004. *Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals: A Practical Identification Manual*. CABI Publishing, Cambridge.

Buke, D., 2001: *Viral diseases: In: BSAVA Manual of Ornamental Fish*, (2 Ed.), British Small Animal Veterinary Association, Gloucester.

Chiu, C., Cheng, C., Gua, W., Yuan-Kuang Guu, Y., Cheng, W., 2010. Dietary administration of the probiotic, *Saccharomyces cerevisiae* P13, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology* 29, 1053 - 1059.

Comissão Europeia n.º 2007/526/CE. Recomendação da Comissão, de 18 de Junho de 2007, relativa a directrizes sobre o alojamento e os cuidados a prestar aos animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos.

Daniels, R.J.R., 2002. *Freshwater Fishes of Peninsula India*. Universities Press, Hyderabad.

Daskalov, H., 2006. The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. *Food Control* 17, 474–483.

Demarta, A., Kupfera, M., Riegel, P., Harf-Monteil, C., Tonolla, M., Peduzzi, R., Monera, A., Saavedra, M., J., Martínez-Murcia, A., 2008. *Aeromonas tecta* sp. nov., isolated from clinical and environmental sources. *Systematic and Applied Microbiology* 31, 278–286.

Dzikowski, R., Hulata, G., Karplus, I., Harpaz, S., 2001. Effect of temperature and dietary L-carnitine supplementation on reproductive performance of female guppy (*Poecilia reticulata*). *Aquaculture* 199, 323–332.

Endler, J.A., 1980. Natural Selection on Color Patterns in *Poecilia reticulata*. *Evolution* 34, 76-91.

Figueras, M., J., Alperi, A., Saavedra, M., J., Ko, W., Gonzalo, N., Navarro, M., Martínez-Murcia, A., J., 2009. Clinical Relevance of the Recently Described Species *Aeromonas aquariorum*. *Journal of Clinical Microbiology* 47, 3742-3746.

Fishman, M.C., 2001. Genomics. Zebrafish—the canonical vertebrate. *Science* 294, 1290–1291.

Ferguson, H., W. 2006. *Systemic Pathology of Fish; a text and atlas of normal tissues in teleosts and their responses in disease*, 2^o ed.; Scotian Press; Reino Unido, 239

Gullian, M., Villanueva, J., 2009. Efficacy of tricaine methanesulphonate and clove oil as anaesthetics for juvenile cobia *Rachycentron canadum*. *Aquatic Resources* 40, 852–860.

Hamackova, J., Lepicova, A., Kozak, P., Stupka, Z., Kouril, J., Lepic, P., 2004. The efficacy of various anaesthetics in tench (*Tinca tinca* L.) related to water temperature. *Veterinárni medicína* 49, 467–472.

Harms, C., 1996. Treatments for parasitic diseases of aquarium and ornamental fish *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 5, 54-63.

Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M., 2010. Herbal supplementation diets on hematology and innate immunity in goldfish against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology* 28, 354 - 361.

Hatha, M., Vivekanandhan, A., A., Joicea, G., J., Christo., 2005. Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish. *International Journal of Food Microbiology* 98, 131–134.

Helfman, G.S., Collette, B.B., Facey, D.E., Bowen, B.W., 2009. *The Diversity of Fishes*. Wiley–Blackwell, UK.

Heo, G.J., Shin, G., 2010. Efficacy of benzocaine as an anaesthetic for Crucian carp (*Carassius carassius*). *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 37, 132–135.

Hilliman, A., 2001: *Fungal diseases: In: BSAVA Manual of Ornamental Fish, (2 Ed.)*, British Small Animal Veterinary Association, Gloucester.

Hseu, J.R., Yeh, S.L., Chu, Y.T., Ting, Y.Y., 1998. Comparison of efficacy of five anesthetics in goldlined sea bream, *Sparus sarba*. *Acta Zoologica Taiwanica* 9, 35–41.

Hunn, J., B., Allen, J., L., 1974. Movement of drugs across the gills of fishes. *Annual Review of Pharmacology* 14, 47–55.

Jacobs, L., Chenia, H., Y., 2007. Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems. *International Journal of Food Microbiology* 114, 295–306.

Kümmerer, K., 2009. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere* 75, 417–434.

King, W.V., Hooper, B., Hillsgrave, S., Benton, C., Berlinsky, D.L., 2005. The use of clove oil, metomidate, tricaine methanesulphonate and 2-phenoxyethanol for inducing anaesthesia and their effect on the cortisol stress response in black sea bass (*Centropristis striata* L.). *Aquatic Resources* 36, 1442–1449.

- Lamason, R.L., Mohideen, M.A., Mest, J.R., Wong, A.C., Norton, H.L., Aros, M.C., Jurynek, M.J., Mao, X., Humphreville, V.R., Humbert, J.E., Sinha, S., Moore, J.L., Jagadeeswaran, P., Zhao, W., Ning, G., Makalowska, I., McKeigue, P.M., O'donnell, D., Kittles, R., Parra, E.J., M., N.J., Grunwald, D.J., Shriver, M.D., Canfield, V.A., Cheng, K.C., 2005. SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. *Science* 310, 1782–1786.
- Lawrence, C., J.P. Ebersole, J., P., Kesseli R., V., 2007. Rapid growth and out-crossing promote female development in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Biol. Fish* 81, 239-246.
- Lewbart, G., A., 2001. Bacteria and Ornamental Fish. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 10 48-56.
- Livengood, E., J., Chapman, F.A., 2007. *The Ornamental Fish Trade: An Introduction with Perspectives for Responsible Aquarium Fish Ownership*. Department of Fisheries and Aquatic Sciences, 124
- Neely, M., N., Pfeifer, J.D., Caparon, M., 2002. *Streptococcus*–zebrafish model of bacterial pathogenesis. *Infection and Immunity* 70, 3904–3914.
- Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J.; 2004). *Microbiologia de Brock*; 10 ed.; Prentice Hall, São Paulo Brazil.
- Magnadóttir, B., 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology* 20, 137 - 151.
- Majumdar, T., Ghosh, S., Pal, J., Mazumder, S., 2006. Possible role of a plasmid in the pathogenesis of a fish disease caused by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* 256, 95-104.
- Martínez-Murcia, A., J., Saavedra, M., J., Mota, V., R., Maier, T., Stackebrandt, E., Cousin S., 2008. *Aeromonas aquariorum* sp. nov., isolated from aquaria of ornamental fish. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 1169-1175.
- Massee, K., C., Rust, M., B., Hardy R., W., Stickney, R., R., 1995. The effectiveness of tricaine, quinaldine sulfate and metomidate as anesthetics for larval fish. *Aquaculture* 134, 351-359.
- Musa, N., Wei, L., S., Shaharom, F., Wee, W., 2008. Surveillance of Bacteria Species in Diseased Freshwater Ornamental Fish from Aquarium Shop. *World Applied Sciences Journal* 3, 903-905.
- Mylonas, C., C., Cardinaletti, G., Sigelaki, I., Polzonetti-Magni, A., 2005. Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. *Aquaculture* 246, 467–481.
- Noga, E., J., 2000. *Fish disease: Diagnosis and Treatment*. Wiley-Blackwell
- Olivier, K. 2001. *FAO/Globefish Research Programme, Vol. 67*. United Nations Food and Agriculture Organisation
- Palmero, B., Weber S., 2010. *Bacterial Diseases of Fish*. In: Roberts, H., E. *Fundamentals of Ornamental Fish Health*. Wiley-Blackwell.
- Parker, J., L., Shaw, J., G., 2011. *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. *Journal of Infection* 62, 109-118.
- Pawar, H., B., Sanaye, S., V., Sreepada, R., A., Harish, V., Suryavanshi, U., Tanu, Ansari, Z., A., 2011. Comparative efficacy of four anaesthetic agents in the yellow seahorse, *Hippocampus kuda* (Bleeker, 1852). *Aquaculture* 311, 155–161.
- Pelicice, M. P., Agostinho, A., A., 2005. Perspectives on ornamental fisheries in the upper Paraná River floodplain, Brazil. *Fisheries Research* 72, 109–119.

Petersen, A., Dalsgaard, A., 2003. Antimicrobial resistance of intestinal *Aeromonas* spp. and *Enterococcus* spp. in fish cultured in integrated broiler-fish farms in Thailand. *Aquaculture* 219, 71–82.

Pitarangsi, C.E., P.; Whitmire, R.; Tirapat, C.; Formal, S.; Dammin, G. J.; Tingtalapong, M., 1981. Enteropathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides*: Prevalence Among Individuals With and Without Diarrhea in Thailand. *Infection and Immunity*, 666-673.

Prescott, L.M., 2002. Appendix IV: Classification of Prokaryotes according to the Second Edition of Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. In: Companies, T.M.H. (Ed.), *Microbiology*.

Pressley, M., Phelan, P., E., Witten, P., E., Mellon, M., T., Kim, C., H., 2005. Pathogenesis and inflammatory response to *Edwardsiella tarda* infection in the zebrafish. *Developmental and Comparative Immunology* 29, 501 - 513.

Plouffe, D., A., Hanington P., C., Walsh J., G., Wilson E., C., Belosevic M., 2005. Comparison of select innate immune mechanisms of fish and mammals. *Xenotransplantation* 12, 266-277.

Poobalane, S., Thompson, K., D., Ardó, S., Verjan, N., Han, H., Jeney, G., Hirono, I., Aoki, T., Adams, A., 2010. Production and efficacy of an *Aeromonas hydrophila* recombinant S-layer protein vaccine for fish. *Vaccine* 28, 3540–3547.

Radu, S., Ahmad, N., Ling, F., H., Reezal, A., 2003. Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species from retail fish in Malaysia. *International Journal of Food Microbiology* 81, 261–266.

Reis, R.E., Kullander, S. O., Ferraris, C. J., 2003. Check list of the freshwater fishes of the south and central América. *Edipucas*, 729 pp.

Reznick, D., Buckwater, G., Groff, J., Elder, D., 2001. The evolution of senescence in natural populations of Guppies (*Poecilia reticulata*) a comparative approach. *Experimental Gerontology* 36, 791-812.

Rieger, A., M., Barreda, D., R., 2011. Antimicrobial mechanisms of fish leukocytes. *Developmental and Comparative Immunology* (article in press).

Rodríguez, I., Novoa, B., Figueras, A., 2008. Immun response of zebrafish (*Danio rerio*) against a newly isolated bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology* 25, 239 - 249.

Sakano, H., Iguchi, K., 2009. Food Web Structure Composed of Alien Fishes in Okinawa, Japan: A Stable Isotope Approach. *Journal of Freshwater Ecology* 24, 357-365.

Sasmal, D., Banerjee, T., Bandyopadhyay, S., Abraham, T., J., 2004. Antibiotic sensitivity of bacterial flora associated with ornamental fish. *Indian Journal of Fisheries* 51, 245-249.

Saxby, A., Adams, L., Snellgrove, D., Wilson, R., W., Sloman, K., A., 2010. The effect of group size on the behaviour and welfare of four fish species commonly kept in home aquaria. *Applied Animal Behaviour Science* 125, 195–205.

Selvaraj, V., Sampath, K., Sekar, V., 2005. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology* 19, 293 - 306.

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

Sierra, J., C., Suarez, G., Sha, J., Baze W., B., Foltz, S., M., Chopra, A., K., 2010. Unraveling the mechanism of action of a new type III secretion system effector AexU from *Aeromonas hydrophila*. *Microbial Pathogenesis* 49, 122 - 134.

- Subramanian, S., Mackinnon, S., L., Ross, N., W., 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 148, 256–263.
- Sumanas, S., Lin, S., 2004. Zebrafish as a model system for drug target screening and validation. *Drug Discovery Today: TARGETS* 3, 89-96.
- Tamaru, C.S., Cole, B., Bailey, R., Brown, C., Ako, H., 2001. A Manual for Commercial Production of the Swordtail, *Xiphophorus helleri*. CTSA Publication 128.
- Tlusty, M., 2002. The benefits and risks of aquacultural production for the aquarium trade. *Aquaculture* 205, 203– 219.
- Treves-Brown, K., 2000. Applied Fish Pharmacology. Kluwer Academic Publishers, Norwell.
- Tsantilas, H., Galatos, A., D., Athanassopoulou, F., Prassinou, N., N., Kousoulaki, K., 2006. Efficacy of 2-phenoxyethanol as an anaesthetic for two size classes of white sea bream, *Diplodus sargus* L., and sharp snout sea bream, *Diplodus puntazzo* C. *Aquaculture* 253, 64– 70.
- Vandepitte, J., World Health Organization, 2003. Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. World Health Organization
- Vaseeharan, B., Ramasamy, P., Murugan, T., Chen, J., C., 2005. In vitro susceptibility of antibiotics against *Vibrio* spp. and *Aeromonas* spp. isolated from *Penaeus monodon* hatcheries and ponds. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26, 285–291.
- Velisek, J., Stara, A., Li, Z., Silovska, S., Turek, J., 2011. Comparison of the effects of four anaesthetics on blood biochemical profiles and oxidative stress biomarkers in rainbow trout. *Aquaculture* 310, 369–375.
- Vivekanandhan, G., Savithamani, K., Hatha, A., Lakshmanaperumalsamy, P., 2002. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India. *International Journal of Food Microbiology* 76, 165–168.
- Weber, R., A., Peleteiro, J., B., Martín, L., O., Aldegunde, M., 2009. The efficacy of 2-phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222 as anaesthetic agents in the Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). *Aquaculture* 288, 147–150.
- WHO (World Health Organization), 2008. Guidelines for Drinking-water Quality. 3^o ed, 1, Geneva, 224-225
- Woody, C., A., Nelson, J., Ramstad, K., 2002. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials. *Journal of Fish Biology* 60, 340–347.
- Wildgoose, W., H., 2001. Skin disease. In: BSAVA (Ed.), Manual of Ornamental Fish, Gloucester.
- Wischnath, L., 1993 Atlas of livebearers of the world. T.F.H. Publications, Inc., United States of America
- Yang, H., Tiersch, T.R., 2009. Current status of sperm cryopreservation in biomedical research fish models: Zebrafish, medaka, and Xiphophorus"; *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*; 149; p. 224-232. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*; 149, 224-232.
- Yin, Z., Lam, T., J., Sin, Y., M., 1995. The effects of crowding stress on the non-specific immune response in fancy carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish & Shellfish Immunology* 5, 519-529.
- Zahl, I., H., Kiessling, A., Samuelsen, O., B., Hansen, M., K., 2009. Anaesthesia of Atlantic cod (*Gadus morhua*) — Effect of pre-anaesthetic sedation, and importance of body weight, temperature and stress. *Aquaculture* 295, 52–59.