

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DIEGO SANTA CLARA MARQUES

**Isolamento e Identificação Taxonômica de *Aeromonas*
sp. em Tambaquis (*Colossoma macropomum*) e Análise
do Perfil de Lectinas Séricas Frente a um Desafio com
os Isolados Endógenos.**

ORIENTADORA: Prof.a Dr.a Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho,
Pesquisadora 1B do CNPq

CO-ORIENTADORA: Prof.a Dr.a Elba Verônica Matoso Maciel de Carvalho

Recife

2015

DIEGO SANTA CLARA MARQUES

Isolamento e Identificação Taxonômica de *Aeromonas sp.* em Tambaquis (*Colossoma macropomum*) e Análise do Perfil de Lectinas Séricas Frente a um Desafio com os Isolados Endógenos.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Biotecnologia.

Recife

2015

Catálogo na fonte

Elaine Barroso

CRB 1728

Marques, Diego Santa Clara

Isolamento e identificação taxonômica de *Aeromonas* sp em Tambaquis (*Colossoma macropomum*) e análise do perfil de lectinas séricas frente a um desafio com os isolados endógenos/ Diego Santa Clara Marques– Recife: O Autor, 2015.

56 folhas: Il., fig., tab.

Orientadora: Luana Cassandra Breintebach Barroso Coelho

Coorientadora: Verônica Matoso Maciel de Carvalho

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas, Ciências Biológicas, 2015

Inclui bibliografia e anexo

- 1. Tambaqui (peixe) 2. Bactérias gram-negativas 3. Lectinas I. Coelho, Luana Cassandra Breintebach Barroso (orientadora) II. Carvalho, Verônica Matoso Maciel de (coorientadora) III. Título**

597

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-262

DIEGO SANTA CLARA MARQUES

**Isolamento e Identificação Taxonômica de *Aeromonas sp.* em Tambaquis
(*Colossoma macropomum*) e Análise do Perfil de Lectinas Séricas Frente a um
Desafio com os Isolados Endógenos.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Pernambuco, como parte dos requisitos à
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Biológicas, área de concentração:
Biotecnologia.

Data da Aprovação
__28__ / __02__ / 2015__

BANCA EXAMINADORA

Prof.a Dr.a LUANA CASSANDRA BREITENBACH BARROSO COELHO
Departamento de Bioquímica - UFPE

Prof.a Dr.a VERA LÚCIA DE MENEZES LIMA
Departamento de Bioquímica – UFPE

Prof. Dr. THIAGO HENRIQUE NAPOLEÃO
Departamento de Bioquímica - UFPE

Recife

2015

“But the Son of man.... He will always be the
cornerstone”

Place of Skulls – Cornerstone

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois Ele é quem faz tudo ser possível em minha vida.

À minha família: minha mãe Aracy de Santa Clara, meu irmão: Dimitri Santa Clara Marques e meu pai: Dimitri José de Souza Marques da Silva, por todo incentivo e amor com que sempre me apoiaram o que tornou possível a conclusão deste trabalho.

À Universidade Federal de Pernambuco pelo ensino ministrado.

À Fundação de Amparo à Ciência e tecnologia Estado de Pernambuco(FACEPE) pela bolsa concedida.

À minha orientadora Prof (a) Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, pela orientação, compreensão e oportunidade a mim concedida.

À minha co-orientadora Prof (a) Dra. Elba Verônica Matoso Maciel de Carvalho por toda colaboração, atenção e carinho com que sempre me acompanhou em toda minha vida científica.

Ao técnico Carlos e ao Laboratório de Bioquímica de Proteínas por toda ajuda e acolhimento.

Ao meu amigo Caio Dias (esse não quebra galho, derruba árvores!).

A todos do laboratório de Fisiologia Animal Comparada e Comportamental: Dijannah, Luciano, Cybele (só os fortes entenderão), Kassia e Jessica.

A todos da Estação de Piscicultura Professor Jonei Koike do Departamento de Pesca da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pela gentileza em ceder os espécimes para a pesquisa.

RESUMO

O peixe amazônico tambaqui (*Colossoma macropomum*) é uma das espécies comerciais mais importantes da atividade piscícola no Brasil ocupando a terceira posição no “ranking” nacional. Doenças são as principais causas de perdas em piscicultura intensiva. A pressão que as técnicas de cultivo exercem sobre o organismo do peixe, torna-o suscetível a ação de patógenos. Dentre os patógenos de importância para a piscicultura destacam-se as bactérias pertencentes ao gênero *Aeromonas*, sendo agentes etiológicos de diversas patologias, com capacidade de gerar surtos de mortalidades em criações de peixes. O nosso grupo de pesquisa identificou inicialmente a lectina presente no soro do tambaqui (ComaSeL). Lectinas são proteínas ou glicoproteínas que se ligam especifica e reversivelmente a carboidratos. O objetivo deste trabalho foi isolar e identificar espécies de *Aeromonas* de tambaquis submetidos a estresse por confinamento, e avaliar o perfil de expressão da lectina presente no soro do peixe frente a desafio com espécies de *Aeromonas* isoladas do tambaqui. Para o isolamento de *Aeromonas* foram utilizados três peixes submetidos a estresse de confinamento, (permanência em tanque de 1000 L com a lâmina d’água no limiar do dorso do animal por 96 h) e três peixes utilizados como grupo controle (retirados diretamente do viveiro). O isolamento de *Aeromonas* foi efetuado do tecido branquial e seguiu procedimento padrão de maceração, diluição do macerado em água destilada esterilizada e semeio em meios específicos. A identificação em nível de gênero e espécie seguiu metodologia padrão de testes fisiológicos e bioquímicos. Para o desafio foram selecionadas duas cepas pertencentes a espécies reconhecidamente patogênicas (*A. caviae* e *A. bestiarum*). Trinta e seis tambaquis foram divididos em três grupos: infectado 1 (desafiado com *A. bestiarum*), infectado 2 (desafiado com *A. caviae*) e o grupo controle. O desafio foi feito com a aplicação de 1 mL de uma suspensão de crescimento recente com concentração final de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL de cada cepa em seu respectivo grupo, e de 1 mL de solução fisiológica no grupo controle. Nos tempos 0, 24, 48 e 72 h três animais de cada grupo foram sacrificados e amostras de sangue foram coletadas. A lectina foi avaliada através da atividade hemaglutinante específica. Ao total foram isoladas 72 cepas pertencentes ao gênero *Aeromonas*. A maior parte dos isolados (97%) foi obtida dos peixes submetidos ao estresse, confirmando que o estresse favorece a proliferação de patógenos. Houve prevalência das espécies *A. bestiarum* (48,6%) e *A. caviae* (37,5%) que são descritas como causadoras de septicemia por *Aeromonas* móveis. Em relação ao perfil de expressão da lectina, os tratamentos não apresentaram diferenças significativas entre si. Os tratamentos controle e infectado 1 não variaram significativamente entre os tempos. O tratamento infectado 2 apresentou aumento significativo na atividade hemaglutinante específica a partir de 48 h após a infecção. Comparando a atividade hemaglutinante em cada período para os três tratamentos, observou-se que no tratamento 1, 24 h após a infecção, houve diferença significativa na atividade hemaglutinante. Os resultados indicam que *A. caviae* e *A. bestiarum* foram capazes de estimular a expressão de lectinas no soro do tambaqui.

Palavras chaves: Tambaqui, Isolamento de *Aeromonas*, Lectinas, Atividade Hemaglutinante Específica, Estresse em Peixes.

ABSTRACT

The tambaqui (*Colossoma macropomum*) is one of the most important commercial species of fish activity in Brazil. It offers a great quality of meat, excellent standard of high growth and hardiness, which favors its creation in intensive fish farming. Diseases are the main causes of losses in intensive fish farming. The pressure that cultivation techniques have on the fish's body makes it susceptible to pathogens action. Among the pathogens of importance to fish there are the bacteria belonging to the genus *Aeromonas*, being etiological agents of various diseases, capable of generating mortality outbreaks in fish creations. Our research group identified the lectin there is present in the serum of tambaqui (ComaSeL). Lectins are proteins or glycoproteins that bind carbohydrates specifically and reversibly. The objective of this study was to isolate and identify species of tambaqui's *Aeromonas* subjected to stress confinement, and evaluate the expression profile of this lectin in fishs infected with *Aeromonas* species isolated from tambaqui. For the isolation of *Aeromonas* were used three fish undergoing stress of confinement, held in 1000 L tank with a water depth in the animal's back the threshold for 96 h, and three slaughtered direct from fish nursery. The isolation of *Aeromonas* was made of gill tissue and followed standard procedure of maceration, dilution macerated in sterile distilled water and sow in specific media. The identification of the genus and species, followed standard methodology of physiological and biochemical tests. For the challenge were selected two strains of recognized pathogenic species (*A. caviae* and *A. bestiarum*). Thirty-six tambaquis were divided into three groups: 1 infected (challenged with *A. bestiarum*), infected 2 (challenged with *A. caviae*) and the control group. The challenge was done by applying 1 mL of a recent growth in suspension with a final concentration of 1.5×10^8 CFU / mL for each strain in the respective group, and 1 mL of saline control group. At 0, 24, 48 and 72 h three animals from each group were sacrificed and blood samples were collected. The lectin was evaluated by specific hemagglutination activity assay. In total were isolated 72 strains belonging to the genus *Aeromonas*. The majority of isolates (97%) was obtained from fish subjected to stress, confirming that stress favors the proliferation of pathogens. The prevalence of *A. bestiarum* (48.6%) and *A. caviae* (37.5%) that are described as sepsis-causing by mobile *Aeromonas*. In relation to the lectin expression profile, the treatments were not significantly different from each other. The control treatments and infected 1 did not vary significantly between the times. Treatment infected 2 showed an increase in specific hemagglutination activity from 48 h after infection. Comparing the hemagglutinating activity of each period for the three treatments, It was observed that the treatment 1, 24 h after infection, there was a significant difference in hemagglutination activity. The results indicate that *A. bestiarum* and *A. caviae* were capable of stimulating the expression of lectins in serum tambaqui.

Key words: Tambaqui, Isolation of *Aeromonas*, Lectin Protein, Specific Hemagglutination Activity, Stress on fishies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Percentual de criação do tambaqui em relação a piscicultura total nas regiões Brasileiras.....18

Figura 2. Participação do sistema nervoso central na resposta ao estresse (TAVARES-DIAS, 2009).....21

Figura 3. Diagrama descrevendo as condições necessárias para o surgimento de doenças em.....22

Capítulo 1:

Figure 1. Distribution per species of *Aeromonas* strains found in gill tissues of *Colossoma macropomum* submitted or not to confinement stress.....52

Figure 2 Variations in serum lectin levels in juvenile *Colossoma macropomum* challenged with an intraperitoneal injection of *Aeromonas bestiarum* and *Aeromonas caviae* strains isolated from confinement stressed fishes.....53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Novas espécies do gênero *Aeromonas*24

Capítulo 1:

Tabela 1. Number of bacterial colonies in homogenates of gills from *Colossoma macropomum* submitted or not to confinement stress.....50

Tabela 2. Classification by specific biochemical assays of *Aeromonas* species found in this work colonizing *Colossoma macropomum* gills.....50

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 Piscicultura no Brasil e no mundo.....	14
2.2 Sistemas de cultivo de peixes.....	15
2.3 O Tambaqui.....	16
2.4 Estresse em peixes cultivados.....	19
2.5 Aeromonas.....	23
2.6 Lectinas.....	26
3. OBJETIVOS.....	27
4. REFERÊNCIAS.....	28

CAPÍTULO I

Influence stress confinement on the bacterial population in the Amazonian fish tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) and changes in serum lectin levels to a bacterial challenge.	35
Abstract.....	36
1. Introduction.....	37
2. Materials and methods.....	39
2.1 <i>Animals and stress induction</i>	39
2.2 <i>Isolation of Aeromonas colonies</i>	39
2.3 <i>Biochemical identification</i>	40

2.4	<i>Immunological challenge towards infection by Aeromonas</i>	41
2.5	<i>Protein concentration and hemagglutinating activity</i>	41
2.6	<i>Statistical analysis</i>	42
3.	Results and discussion	42
4.	Conclusion	44
	Acknowledgments	45
	References	45
	Anexo	54

1. INTRODUÇÃO

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é um peixe nativo dos rios amazônicos e de elevada importância econômica, devido ao seu proeminente padrão de crescimento, que, em seu habitat natural, pode atingir 1m de comprimento com 30 kg de peso. A rusticidade característica da espécie, assim como, a excelente qualidade da carne, cujo sabor é apreciado internacionalmente, dão ao tambaqui o respaldo para ocupar o terceiro lugar no ranking da piscicultura nacional (DAIRIKI; SILVA, 2011; LEITE et al., 2013).

O aumento da produtividade industrial do tambaqui faz com que a maior parte da produção seja feita pelo sistema de cultivo intensivo, caracterizado pela alta densidade de espécimes e elevado nível de estresse (ARARIPE et al., 2013) induzindo, por sua vez, à elevação da incidência de enfermidades infecciosas e parasitárias. Este tipo de cultivo, com alta estocagem de animais por unidade de estoque torna os animais vulneráveis às doenças.

As maiores perdas de produção na piscicultura são causadas por doenças. Os principais agentes causadores de infecções bacterianas que atingem os peixes são as diferentes espécies de bactérias do gênero *Aeromonas* (LIMA, 2007). Até o presente momento não existem dados sobre o panorama de bactérias que causam doenças no tambaqui.

Este trabalho tem como objetivo iniciar a criação de um banco de dados de bactérias que causam doenças no tambaqui, passo essencial para o desenvolvimento de medidas profiláticas a serem empregadas no cultivo do peixe, o que em última instância irá incrementar substancialmente a produção do setor.

De acordo com a literatura as lectinas são proteínas envolvidas na imunidade inata dos peixes, que a resposta imunológica mais desenvolvida em peixes, identificando patógenos através do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos, que são carboidratos presentes unicamente em células não-próprias (IMAMICHI; YOKOYAMA, 2010; LINO et al., 2013; MAGNADÓTTIR, 2006; SAHOO et al., 2008). A descoberta recente de uma lectina presente no soro do tambaqui que apresenta atividade antibacteriana (MACIEL CARVALHO et al., 2012) despertou o interesse no estudo dessa proteína que pode trazer novas abordagens no desenvolvimento de espécimes resistentes de tambaqui com alta capacidade produtiva. Neste sentido, o objetivo deste trabalho é fornecer subsídios para otimizar as técnicas de manejo preventivo de doenças no tambaqui, através da iniciação da montagem de um

banco de dados dos patógenos que acometem o tabaqui e do estudo do perfil de lectinas expressas no soro do tabaqui frente a uma infecção bacteriana.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Pisciculturas no Brasil e no mundo

A aquicultura surgiu na antiguidade como forma de produção de alimento. De acordo com Zimmermann (2001) e com o Ministério da Pesca e da Aquicultura (MPA 2009) a atividade da aquicultura data de 4.000 a 5.000 anos atrás. Baillard (2003) explica que há registro do cultivo de tilápia no Egito antigo, por pintura da captura desse peixe em um tanque, na tumba de Akti Hetep.

Segundo Ramos et al. 2010, aquicultura é o cultivo de organismos cujo ciclo de vida, em condições naturais, se dá total ou parcialmente no meio aquático Silva (2005), afirma que há duas condições básicas para que um produto seja considerado de origem aquícola: o primeiro, é que haja intervenção humana durante o processo de criação ou cultivo, visando o aumento da produtividade; o segundo é preciso que a unidade produtora tenha um proprietário individual ou coletivo que a diferencie dos corpos d'água públicos.

A produção e reprodução de peixes em condições controladas, é denominada Piscicultura. Segundo Kubitz 2010, o pescado é a proteína animal mais consumida em todo o mundo, principalmente entre as populações mais pobres do planeta. De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO 2010) cada habitante do planeta consome, em média, 18,8 kg de pescado por ano. Em 2011, a produção mundial atingiu 154 milhões de toneladas, das quais 131 milhões foram destinadas ao consumo humano (ROUSSEFF, 2011). O Balanço MPA (2013), informa que o Brasil alcançou a marca histórica de volume acima de 2,5 milhões de toneladas na produção de pescado no ano de 2013.

O Brasil possui 12% das reservas disponíveis de água doce do planeta, compostas por grandes corpos d'água, bacias hidrográficas, muitos lagos e açudes. Estas características aliadas a condições climáticas favoráveis, torna a piscicultura uma das atividades agrícolas que mais se desenvolve no país (Sant'ana *et al*, 2012; FAO 2010).

Entre as principais espécies de peixes cultivados no Brasil estão os nativos da bacia Amazônica e das áreas dos pântanos na região Centro-Oeste: tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), carpa (*Cyprinus carpio*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*), tambaqui (*Colossoma macropomum*), tambacu (híbrido de tambaqui e pacu), o bagre nativo chamado turubim ou cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) e o pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) (MPA, 2013).

2.2 Sistemas de cultivo de peixes

Existem diferentes sistemas de cultivo de peixes. Os sistemas produtivos podem ser classificados de acordo com o grau de interferência do homem no ambiente aquícola, e das variações da técnica de manejo adotada para o cultivo. Assim sendo, os sistemas de cultivo podem ser divididos em: extensivo, semi-intensivo, intensivo e super-intensivo (Zimmermann e Fitzsimmons, 2004; OSTRENSKY; BOEGER, 1998).

O sistema extensivo geralmente é praticado em locais, cuja primeira finalidade não foi a criação de peixes, sendo aproveitada uma área já existente para outra atividade como um açude para irrigação, por exemplo, ou um reservatório natural como uma lagoa. Emprega um baixo número de espécimes por unidade de área (de 500 a 1.000 alevinos por ha) e cujas trocas de água ocorrem somente na dependência das chuvas. Não se usa praticamente nenhum implemento tecnológico nem são oferecidos suplementos ou complementos alimentares aos peixes, ficando a capacidade nutricional do ambiente, dependente da produtividade natural da água que, por sua vez, depende da quantidade de nutrientes minerais e da matéria orgânica da água e do solo. Também, não há controle sobre a reprodução. Apesar do baixo custo, a produção também é baixa e varia de 100 a 1000 Kg/ha/ano, capacidade essa que não atende aos interesses da indústria (Zimmermann e Fitzsimmons, 2004; Ostrensky & Boeger 1998).

O sistema semi-intensivo de cultivo de peixes é realizado em tanques escavados especialmente para a atividade ou em açudes que se tornam viveiros. Utiliza-se técnicas de criação para incrementar a produção, como por exemplo, a maximização da produção de alimento natural contido no meio (fito e zooplâncton, bentos e macrófitas) através da introdução de adubos orgânicos e químicos que fornecem nutrientes minerais e algumas vezes, ração comercial. A troca de água é feita diariamente em volume de 5 a 10% do volume total do tanque. Alguns parâmetros de qualidade da água como pH, O₂ dissolvido, temperatura, turbidez são monitorados. Os tanques são povoados somente

com peixes de cultivo e a densidade de estocagem varia de 5.000 a 25.000 alevinos por hectare e a produção pode alcançar de 2.500 a 12.500 kg/ha/ano (Zimmermann e Fitzsimmons, 2004; Ostrensky & Boeger 1998).

Os sistemas intensivos utilizam as mais avançadas tecnologias no aumento da produção, além de maior densidade de animais por unidade de área. Dado o grande volume de espécimes a alimentação depende inteiramente de aporte externo e comumente se usa ração balanceada visando o ganho de peso dos animais. Diante do alto teor de biomassa presente, o fluxo de água deve ser maior, inclusive, para carrear as excretas, com trocas diárias de 10 a 35% do volume total. Para manter o nível de O₂ dissolvido em condições ótimas (até 8ppm), podem ser utilizados aeradores mecânicos. A qualidade da água é rigorosamente monitorada nestes sistemas, principalmente devido à alta densidade de animais, o que gera uma alta carga de produtos de excreção bem como o aumento da matéria orgânica na água devido a intensa oferta alimentar. A estes fatores afetam negativamente o organismo dos peixes podendo levar ao estado de estresse crônico caso esta situação pendure por muito tempo. Em viveiros escavados podem ser colocados entre 25.000 a 100.000 alevinos por hectare e dependendo da duração da safra, a produção pode chegar de 12.500 a 50.000 kg/ha/safra (Zimmermann e Fitzsimmons, 2004; Ostrensky & Boeger 1998).

É um sistema produtivo de peixes, relativamente novo no Brasil, mas que já apresenta boa aceitação entre os criadores em escala industrial. Os peixes são estocados em altas densidades. É característico o uso de tanques de pequeno porte, construídos em alvenaria para favorecer a troca do volume total de água em períodos curtos de tempo ou longos tanques que permitam um fluxo de água constante para sustentar os níveis de O₂ dissolvido. Os animais são alimentados exclusivamente por rações balanceadas e prensadas, que têm alto custo. Desse modo, para tornar a atividade comercialmente viável são criadas apenas espécies de expressivo valor de mercado (Nascimento e Oliveira, 2010).

2.3 O Tambaqui

O tambaqui, *Colossoma macropomum*, (CUVIER, 1818) é um peixe pertence a classe Osteichthyes, subclasse Actinopterygii, ordem Characiformes, família Characidae e subfamília Serrasalminae (EMBRAPA 2010; Araujo-Lima e Goulding, 1998). É um peixe originário da América do Sul, das bacias dos rios Amazonas e Orinoco,

considerado como o segundo maior peixe de escamas de água doce da América do Sul, ficando atrás apenas do pirarucu, *Arapaima gigas* (Fisheries & Aquaculture 2013; Jacometo *et al.*, 2010).

Tropical de águas ricas em nutrientes, bem adaptado a altas temperaturas médias, entre 25 °C e 34°C. É capaz de resistir a baixas concentrações de O₂, na água devido às estratégias adaptativas compensatórias que possui, tais como: aumento dos batimentos cardíacos, velocidade de respiração e afinidade da hemoglobina pelo oxigênio e ainda redução da taxa metabólica e de crescimento (Gomes *et al.*, 2006; Araújo-Lima e Gomes, 2005).

Rústico, apresenta rápido crescimento e uma carne tenra e macia bastante apreciada no mercado nacional e internacional. Em seu ambiente natural pode chegar a pesar 30 Kg e medir 1m (Kubitza, 2004; Gomes *et al.*, 2010).

Apesar do cultivo do tambaqui poder ser desenvolvido em todo país, a baixa resistência em climas frios, com risco de perdas, estimula a piscicultura nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste devido às características do clima favorável e onde o tambaqui desfruta de grande aceitação no mercado (Kubitza e Kubitza, 2004). De acordo com (MENDONÇA; UENF, 2007), o tambaqui, responde a fotoperíodo e a variações de pH, apresentando melhor desempenho em águas mais escuras e ácidas.

Segundo a EMBRAPA (2010), a produção do tambaqui aumentou de forma considerável, motivando pesquisas em todas as áreas do conhecimento da espécie e seu grande potencial para aquicultura. Segundo Lima e Goulding (1998), o tambaqui tornou-se o peixe símbolo da Amazônia porque ele incorpora a maioria dos problemas que precisam ser resolvidos para se manejar a pesca e ao mesmo tempo desenvolver a aquicultura. O tambaqui é a principal espécie nativa cultivada no Brasil (Kubitza *et al.* 2010) e está presente em 24 dos 27 estados do Brasil. De cada cinco tambaquis consumidos, quatro são provenientes de cativeiro (Santos *et al.*, 2013; Jacometo *et al.*, 2010). A Figura 1 mostra o percentual da criação de tambaqui no Brasil em relação a piscicultura total.

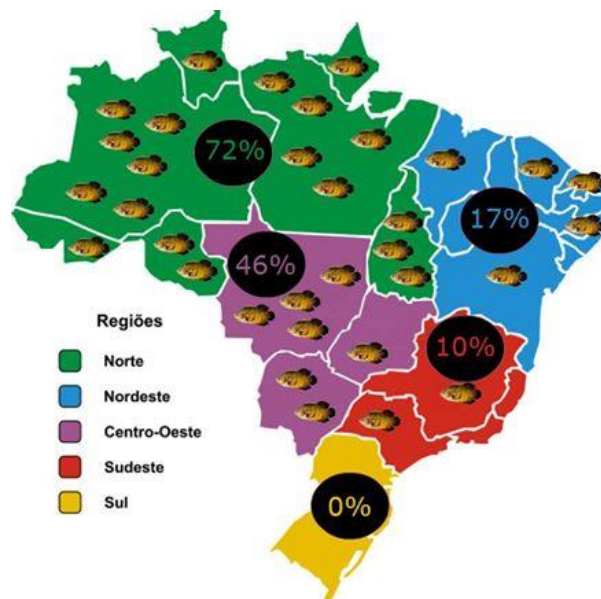


Figura 1: Percentual de criação do tambaqui em relação a piscicultura total nas regiões Brasileiras

Em 2010, o tambaqui foi a 3ª espécie de peixe mais cultivada no Brasil ficando atrás apenas da tilápia e da carpa. Um ganho de 15.480,1 toneladas de pescado de tambaqui foi verificado entre 2008 e 2010, representando um aumento de aproximadamente 28% na produção do triênio (SOUZA et al., 2014).

De acordo com Kubitza *et al* (2012), parte da produção de peixes redondos(tambaqui, pacu e tambacu) é escoada através de atacadistas e supermercados das principais cidades do Nordeste e Sudeste, mercados com grande potencial de aumento no consumo, em especial para produtos mais industrializados. Isso abre boas perspectivas para a expansão da aquicultura destes peixes nos próximos anos.

Quanto ao hábito alimentar, o tambaqui é onívoro atuando como frugívoro. A preferência na dieta varia com a disponibilidade de água no ambiente. Sua alimentação é composta principalmente de frutos e sementes, que são triturados pelos seus dentes fortes e arredondados, na época de grandes enchentes, quando o volume de água dos rios é maior e forma áreas inundadas. O plâncton, que adquire por filtração, é a preferência nas épocas de seca quando há escassez destes recursos. No período de reprodução não se alimenta, nutrindo-se da reserva de gordura que acumulou durante as grandes enchentes (Nunes, et al. 2006 Silva et al., 2003; Claro-Junior et al., 2004).

Entre as características morfológicas do tambaqui estão o corpo romboidal, alto, achatado e serrilhado no peito; nadadeira curta, adiposa óssea com raios na extremidade; dentição poderosa, com dentes molariformes adaptados para quebrar as

duras castanhas que fazem parte de sua dieta e rastros branquiais longos e numerosos associados à filtração do plâncton. Em suas brânquias, podem ser observados espinhos longos e finos. Apresenta coloração no dorso pardo-escuro e ventre esbranquiçado. Os peixes adultos têm manchas escuras irregulares no ventre e na nadadeira caudal e alevinos têm uma mancha circular preta na nadadeira caudal que desaparece lentamente com o crescimento(FREITAS et al., 2014).

Na natureza, o tambaqui é um peixe reofílico e migratório, de reprodução assexuada com os gametas masculinos e os óvulos das fêmeas liberados na água, resultando em uma pequena porcentagem efetivamente fecundada. Em ambiente nativo o período reprodutivo deste peixe vai de setembro a fevereiro com desovas entre os meses de setembro/outubro até janeiro/fevereiro. Como uma espécie reofílica, o tambaqui nada contra a correnteza para atingir a maturação de seus órgãos reprodutores, por este motivo não se reproduz naturalmente em cativeiro, estando sob estresse de confinamento. É necessária a indução à desova através da aplicação de hormônios gonadotróficos exógenos (Rio Acima, 2012; Vieira *et al*, 2011). A reprodução natural ocorre quando o espécime atinge cerca de 60 cm de comprimento e idade entre 4 e 5 anos. Em condições de cultivo, são utilizados reprodutores com mais de 3 anos de idade (FREITAS et al., 2014).

2.4 Estresse em peixes cultivados

Estresse pode ser definido como uma situação de desafio enfrentada por uma pessoa ou animal, que pode resultar em um dano real ou simbólico. A situação de estresse é uma constante em pisciculturas intensivas, que costumam trabalhar com altas densidades de peixes por unidade de área (CONTE, 2004). Os fatores causadores de estresse, chamados estressores, podem ser classificados seguindo diversos critérios, porem podemos agrupa-los quanto a sua origem em ambientais e sociais. As pisciculturas intensivas expõem os peixes a estressores ambientais inerentes a atividade, como: adensamento, mudanças nos parâmetros físico-químicos da água (concentração de oxigênio, temperatura, pH, alcalinidade, salinidade, densidade ótica);acumulo de excretas nitrogenadas na água, manuseio, transporte e problemas nutricionais (MORGAN; TROMBORG, 2007; SCHRECK; CONTRERAS-SANCHEZ; FITZPATRICK, 2001; WEBER, 2011). Os estressores sociais são mais relacionados a

situações de predação e disputa de território, sendo mais comum em animais de vida livre.

De uma maneira geral todos os estressores induzem uma resposta adaptativa neuro-endócrina no animal, porém quando o estresse perdura por um longo período as mudanças perdem seu caráter adaptativo e passam a debilitar diversas funções primordiais nos peixes, como o crescimento, a reprodução e o sistema imunológico (BARTON, 2002; NARDOCCI et al., 2014). Apesar da variedade de estressores e dos danos que eles podem causar, a resposta ao estresse segue um caminho comum, e os pontos principais que vão determinar o resultado final do desafio enfrentado é a intensidade e duração do estresse.

A resposta fisiológica ao estresse recebe o nome de síndrome da adaptação geral, e envolve o sistema nervoso central pela ação do sistema adrenérgico (hipotálamo-nervos simpáticos-células cromafins) e do eixo hipotálamo-pituitária-interrenal (BARTON, 2002; CHANDROO; DUNCAN; MOCCIA, 2004). A síndrome de adaptação geral é comumente dividida em três fases. A primeira fase é caracterizada pela percepção da situação de desafio pelo organismo e o início de uma cascata de reações que culmina na liberação de catecolaminas pelo sistema adrenérgico e de hormônios corticosteroides, principalmente o cortisol, pelo eixo hipotálamo-pituitária-interrenal (Figura2). O efeito desses hormônios a nível sistêmico compreende a segunda fase. Aumento do débito cardíaco, da absorção de oxigênio, liberação de ácidos graxos livres na corrente sanguínea, liberação de glicose pelo fígado a partir da quebra de glicogênio, e perturbação do balanço hidromineral são resultados da ação do cortisol e das catecolaminas liberadas e sua função é preparar o organismo para superar a situação de desafio (BRYDGES et al., 2009; LIMA et al., 2007; SCHRECK, 2010; VERBURG-VAN KEMENADE et al., 2009). Em resumo os hormônios do estresse alteram o metabolismo realocando recursos energéticos aumentando o potencial de ação física do peixe, porém desfavorecendo funções vitais como reprodução, crescimento e resposta imunológica.

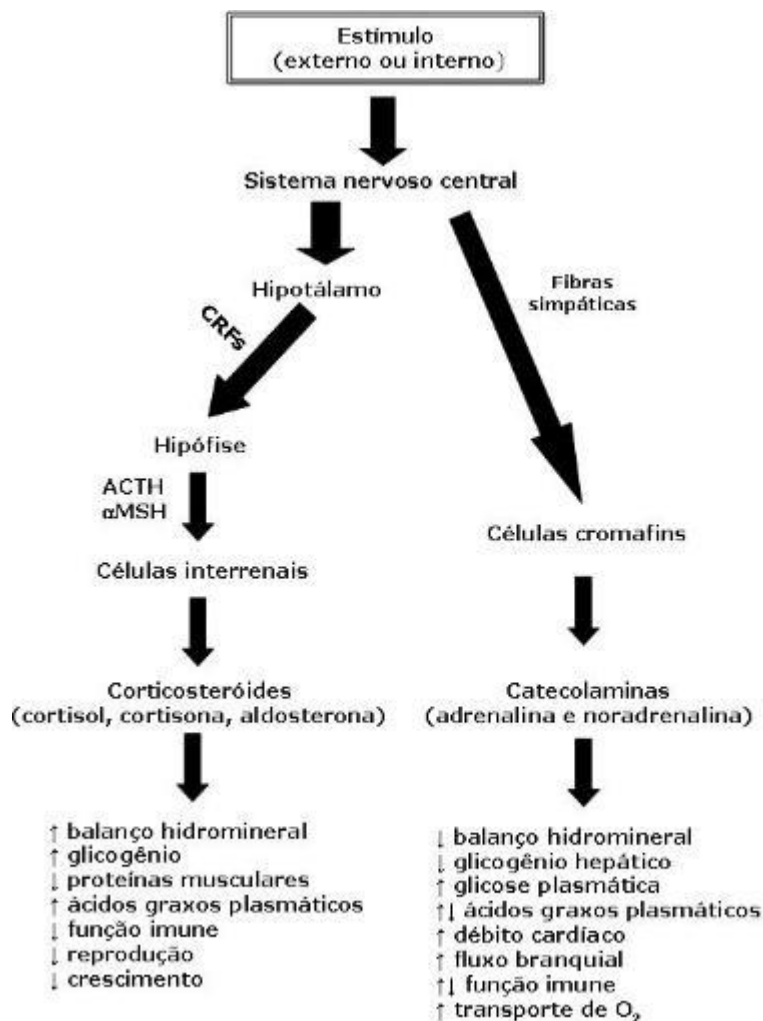


Figura 2: Participação do sistema nervoso central na resposta ao estresse(TAVARES-DIAS, 2009)

A terceira fase da resposta ao estresse ocorre quando o estressor é persistente, fazendo com que todas as mudanças que tinham caráter adaptativo percam o seu efeito, passem debilitar o organismo do peixe. A carga alostática criada pela alteração da homeostase por ação dos hormônios do estresse, principalmente o cortisol, implica no comprometimento de funções essenciais como reprodução, crescimento e resposta imunológica. O estresse prolongado diminui a atividade do sistema complemento, dos níveis de lisozima, atividade aglutinante, concentração de anticorpos e de linfócitos B circulantes. Doenças em piscicultura quase sempre estão ligadas a situações de estresse prolongado enfrentados pelos peixes em criação (TORT, 2011). Todas essas alterações no sistema imunológico reduzem a capacidade dos peixes em lidar com patógenos virulentos, de modo que doenças em piscicultura geralmente são resultados de uma combinação de: ambiente estressante, patógeno virulento e hospedeiro suscetível (Figura 3).



Figura 3: Diagrama descrevendo as condições necessárias para o surgimento de doenças em pisciculturas (fonte: http://www.cetesb.sp.gov.br/mortandade/causas_doencas.php)

Os estudos direcionados a reduzir o estresse em peixes cultivados, tem aumentado com o crescimento da percepção do efeito nocivo do processo nas criações. O reconhecimento dos fatores estressantes e o impacto destes agentes têm sido alvo de estudos em diversas espécies de peixes. Como exemplo temos estudos com jundiá (*Rhamdia quelen*) e carpa húngara (*Cyprinus carpio*) criados em policultivo (Correia et al, 2010), os efeitos da exposição aérea prolongada e das rotinas de manejo (Brandão et al, 2006) em pirarucu (*Arapaima gigas*), o efeito do pós transporte em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Takahashi et al, 2006), estudos da supressão da aeração e das renovações de água em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Saboya et al, 2012), e também os efeitos do transporte em tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Chagas et al, 2012).

É considerável a importância dos estudos correlacionando o estresse aos parasitos e outros patógenos de organismos aquáticos, principalmente daqueles de hospedeiros com potencial para o cultivo e para a comercialização. Frente ao aumento significativo destas atividades no Brasil e no mundo, é de vital necessidade reduzir o estresse no ambiente de cultivo afim de maximizar a produção (ALURU; VIJAYAN, 2009; CNAANI; MCLEAN; HALLERMAN, 2014; LIMA et al., 2007; WEBER, 2011).

2.5 *Aeromonas*

O gênero *Aeromonas* compreende bactérias Gram-negativas, em forma de bastonetes curtos ou cocobastonetes, anaeróbios facultativos e que apresenta resultado positivo nos testes de oxidase e catalase. Crescem em temperaturas que variam de 5°C a 37°C. São organismos ubíquos potencialmente patógenos para o homem e para os peixes (Parker e Shaw, 2010), e em peixes estão presentes na superfície corpórea, nos rins, no fígado e nas brânquias destes animais (Kosinska, 2007).

A taxonomia do gênero das *Aeromonas* foi alvo de diversas modificações ao longo dos últimos vinte anos. O gênero *Aeromonas* pertence à classe Gammaproteobacteria, ordem Aeromonadales e família Aeromonadaceae (Martin-Carnahan e Joseph 2005). A taxonomia do gênero das *Aeromonas* foi alvo de diversas modificações ao longo dos últimos vinte anos. Criado em 1943, até os anos 70 era dividido em dois grandes grupos, que consideravam, entre outras características bioquímicas, a mobilidade e as temperaturas de crescimento. O primeiro o grupo era móvel e classificado como mesofílico, abrangia diversos isolados com características diferentes e tinha como espécie representativa *A. hydrophila*. O segundo grupo, imóvel e classificado como psicrófilico, cuja maioria dos isolados eram de *A. salmonicida*, um importante patógeno de peixes salmonídeos (JANDA; ABBOTT, 2010).

Nos anos 70 estudos de hibridização DNA-DNA foram responsáveis por começar de fato a elucidação da composição da espécies do gênero, revelando que dentre as cepas que pertenciam ao grupo das *Aeromonas* mesofílicas haviam diversos grupos de hibridação (HGs), originando a validação de várias espécies do gênero (JANDA; ABBOTT, 2010)

Atualmente, existem 25 espécies reconhecidas e referenciadas, são elas: *Aeromonas hydrophila* (com três subespécies: *hydrophila*, *dhakensis* e *ranae*), *Aeromonas bestiarum*, *Aeromonas salmonicida* (com cinco subespécies: *salmonicida*, *masoucida*, *smithia*, *achromogenes* e *pectinolytica*), *Aeromonas caviae*, *Aeromonas media*, *Aeromonas eucrenophila*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas veronii*, *Aeromonas jandaei*, *Aeromonas schubertii*, *Aeromonas trota*, *Aeromonas allosaccharophila*, *Aeromonas encheleia* e *Aeromonas popoffii*, *Aeromonas simiae*, *Aeromonas molluscorum*, *Aeromonas bivalvium*, *Aeromonas tecta*, *Aeromonas aquariorum*, *Aeromonas piscicola*, *Aeromonas fluvialis*, *Aeromonas taiwanensis*, *Aeromonas sanarellii*, *Aeromonas diversa* e *Aeromonas rivuli* (BEAZ-HIDALGO; FIGUERAS, 2013). Muitas espécies,

inclusive, foram validadas recentemente e não estão incluídas na mais recente edição do “Bergey Manual of Systematic Bacteriology” (tabela 1).

Tabela 1: Espécies recentemente validadas do gênero *Aeromonas*.

Espécies do Gênero <i>Aeromonas</i>		
<u>Espécie</u>	<u>Referência</u>	<u>Isolado</u>
<i>A. molluscorum</i>	Miñana-Galbis <i>et al.</i> 2004	Moluscos bivalves
<i>A. piscicola</i>	Beaz-Hidalgo <i>et al.</i> 2010	Peixes doentes
<i>A. rivuli</i>	Figueras <i>et al.</i> 2011	Rio de águas calcárias
<i>A. sanarellii</i>	Alperi <i>et al.</i> 2010	Espécimes clínicos
<i>A. simiae</i>	Harf-Monteil <i>et al.</i> 2004	Fezes de macacos
<i>A. taiwanensis</i>	Alperi <i>et al.</i> 2010	Espécimes clínicos
<i>A. tecta</i>	Demarta <i>et al.</i> 2010	Espécimes clínicos e ambientais
<i>A. bivalvium</i>	Miñana-Galbis <i>et al.</i> 2007	Moluscos bivalves
<i>A. aquariorum</i>	Martínez-Murcia <i>et al.</i> 2008	Aquário de peixes ornamentais
<i>A. diversa</i>	Miñana-Galbis <i>et al.</i> 2010	
<i>A. fluvialis</i>	Alperi <i>et al.</i> 2010	Água de rio
<i>A. culicicola</i>	Pidiyar <i>et al.</i> 2002	Intestino de mosquito <i>Culex</i>
<i>A. sharmiana</i>	Saha and Chakrabarti 2006	Água de primavera quente

Fonte: List of Prokaryotic names with standing in nomenclature LPSN – bacterio.net

<http://www.bacterio.net/aeromonas.html>

Quanto ao hábito de vida, estas bactérias são cosmopolitas e podem ser encontradas em diversos ambientes e organismos: em águas de piscicultura (Silva *et al.*, 2010); em carcaças bovinas (Martineli *et al.*, 2010); em estuários (Martins *et al.*, 2009); em peixes comercializados em feiras livres (Silva, 2007); em amostras de leite provenientes de granja (Carneiro & Rossi Junior, 2006) e em diversas espécies de peixes (Álvarez *et al.* 2004; Costa & Cyrino, 2006;). Foram também encontradas em anfíbios (Mouriño *et al.*, 2006) e em frutos do mar (PEREIRA *et al.*, 2004).

. Inicialmente, estes patógenos foram considerados como oportunistas. Entretanto, atualmente, estas bactérias foram relatadas como sendo agentes primários emergentes, possuidores de mecanismos altamente específicos para promover doenças (Figueiredo & Leal, 2008).

As *Aeromonas* apresentam um caráter patológico diverso, sendo responsáveis por causar infecções diversas, que recebem o nome comum de “Septicemia por *Aeromonas* Móveis” (AHS) por serem causadas por cepas de espécies móveis (JOURNAL, 2011; PARKER; SHAW, 2011). As infecções causadas por *Aeromonas* móveis são provavelmente as doenças bacterianas mais comuns em peixes de água doce,

sendo de ocorrência mundial. Os sintomas comuns de AHS incluem: hiperpigmentação da pele, exoftalmia, letargia, inchaço no ventre, eriçamento das escamas e lesões hemorrágicas, principalmente na pele e em órgãos internos (DALLAIRE-DUFRESNE et al., 2013; KUMAR et al., 2013; PEIXOTO; GORDIANO; COSTA, 2012). Esse tipo de infecção é um exemplo claro de doenças induzidas em peixes por situações de estresse, sendo causa comum de prejuízos e criações intensivas. De uma outra forma cepas pertencentes a espécie *A. salmonicida* são consideradas os agentes etiológicos da furunculose, primeira ictiopatologia a preencher completamente os postulados de Kock e é caracterizada pela presença de ulcerações hemorrágicas na pele dos peixes (furúnculos) e por apresentar altas taxas de mortalidade em peixes acometidos por ela (DALLAIRE-DUFRESNE et al., 2013; TAM; GOUGH; TSUJI, 2011).

A diversidade de sintomas e infecções causadas pelas *Aeromonas* são em parte explicadas pelos diversos fatores de virulência apresentados por essas bactérias em cepas isoladas de peixes doentes (LI et al., 2014; PEIXOTO; GORDIANO; COSTA, 2012). Componentes estruturais como flagelos, fíbrilas, lipopolissacarídeos e proteínas de membrana externa são estruturas que facilitam a abordagem, o estabelecimento e a colonização do patógeno e são encontrados descritos em espécies de *Aeromonas* (Beaz-Hidalgo & Figueras, 2013). Além desses fatores estruturais, diversas toxinas e produtos extracelulares produzidos pelas *Aeromonas* que tem implicações virulentas, como: hemolisinas, enterotoxinas citotóxicas, proteases, lipases, DNAses e aerolysina que é o principal fator de virulência encontrado nas *Aeromonas* (BALAKRISHNA; MURALI; BATRA, 2010; JANDA; ABBOTT, 2010).

A aerolisina é uma enterotoxina citotóxica com capacidade para lisar eritrócitos e causar danos irreversíveis às membranas celulares, sendo o principal mecanismo de virulência dessas bactérias (POOBALANE et al., 2008). Em peixes de água doce, a infecção por *A. hydrophila* causa lesões ulcerativas e septicemia hemorrágica, geralmente com acúmulo de fluido no intestino, sendo esses sintomas intimamente ligados a atividade da aerolisina. Schalch *et al* (2000), alertam que lesões nas brânquias dos peixes têm uma importância relevante pois, estes órgãos reagem a presença parasitária com hiperplasia de células epiteliais e mucosas além de realizarem aumento na produção de muco com prejuízo nas trocas gasosas e iônicas (LI; CAI, 2011).

O potencial patogênico das *Aeromonas* tem sido comprovado por diversos trabalhos e diferentes espécies deste gênero recebem destaque quando se trata de

doenças que acometem peixes criados em pisciculturas e seres humanos (PARKER; SHAW, 2011). Pieters et al. (2008), relataram que *A. Bestiarum* é altamente patogênica para peixes, podendo causar necroses em barbatanas, hemorragias e úlceras cutâneas. Martins et al (2008), responsabilizaram *A. caviae* por surtos de mortalidade em criações de tilápia e Dwivedi et al (2008) reportaram um caso de septicemia em seres humanos imunocompetentes causado por esta espécie. *A. poppofi* é uma das espécies de *Aeromonas* não tida como sendo de alto risco, apesar de não ser um patógeno reconhecido, muitos fatores de virulência foram detectados nessas bactérias (Soler et al, 2004).

2.6 Lectinas

As lectinas são grupos de proteínas que se caracterizam por sua capacidade consideravelmente específica para se ligar a carboidratos (Nilsson, 2007). São encontradas em vírus, bactérias, cianobactérias, leveduras, plantas e animais (Loris, 2002; Loris, 2009; Veelders et al, 2010; Huskens et al., 2010; Xu et al., 2012).

Estas proteínas mediam diferentes processos biológicos como interações célula-célula, a indução de apoptose, atividade citotóxica, atividade antibacteriana e antiviral, atividade antiproliferativa em células cancerosas, atividade mitogênica e atividade antitumoral devido a sua capacidade em aglutinar células, e precipitar polissacarídeos, glicoproteínas ou glicolipídios (Lino et al, 2009).

As lectinas ligam-se especificamente e reversivelmente a carboidratos através de um ou mais Domínios de Reconhecimento a Carboidratos (CRD- Carbohydrate Recognition Domains) (Maciel et al., 2004; Medeiros et al., 2010). As principais formas de ligação entre a lectinas e os carboidratos são pontes de hidrogênio, coordenações metálicas, interações de Van der Waals e interações hidrofóbicas (Drickamer, 1998). O reconhecimento específico de carboidratos expressos na superfície celular ou dispersos no meio extracelular é fundamental para uma série de processos importantes nos organismos vivos. Assim as lectinas participam em uma série de funções celulares vitais como aglutinação, reconhecimento celular, simbiose, estimulação da proliferação celular, opsoninação, metástase e apoptose (Dutta et al., 2005).

Diversos estudos envolvendo lectinas de peixes têm sido desenvolvidos, utilizando-se tanto de técnicas imunológicas como de biologia molecular (Magnadottir

et al., 2010; Bah *et al.*, 2011). As lectinas de peixes desempenham importantes papéis nas respostas imunológicas dos peixes, sobretudo na imunidade inata. Neste sentido as lectinas mediam reações de aglutinação, fertilização, imobilização mediada pelo sistema complemento e morte de patógenos. Lectinas de origem humoral ou expressão nas superfícies celulares são fatores críticos para o estabelecimento de relações benéficas com microorganismos colonizadores bem como reconhecem carboidratos expressos sobre membranas de patógenos, evidenciando o invasor como ‘‘não-próprio’’, etapa fundamental para eliminação do patógenos por fagocitose ou pela ativação do sistema complemento (opsoninação) (Dutta *et al.*, 2005; Imamichi and Yokoyama., 2010).

Recentemente foi descoberta por Maciel Carvalho *et al* (2012) uma lectina no soro do tambaqui, denominada ComaSel, que apresenta atividade antibacteriana contra cepas de *Aeromonas sóbria* e *Aeromonas hidrofila*, e pode adicionar um novo panorama as medidas profiláticas em cultivo de tambaquis.

3.0 OBJETIVOS

3.1. Geral: Identificar e caracterizar bioquimicamente as bactérias isoladas do tambaqui estressados sob confinamento e avaliar o perfil de lectinas no soro do tambaqui frente a uma infecção bacteriana.

3.2. Específicos:

- Isolar bactérias do gênero *Aeromonas* das brânquias de tambaquis utilizando meios de cultura específicos.
- Identificar os isolados por características bioquímicas discriminatórias.
- Inocular no tambaqui duas cepas pertencentes a espécies reconhecidamente patogênicas de *Aeromonas* isoladas do peixe sob estresse;
- Análise da lectina presente no soro do tambaqui após inoculação através da atividade hemaglutinante e dosagem proteica.

4.0 REFERÊNCIAS

- Aluru, N. & Vijayan, M.M., 2009. Stress transcriptomics in fish: a role for genomic cortisol signaling. *General and comparative endocrinology*, 164(2-3), pp.142–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19341738> [Accessed February 24, 2014].
- Álvarez, R. J. D. Resistência antimicrobiana em bacterias aisladas de tilápias, agua y sedimento em Venezuela. *Revista Científica, Caracas*, v. 14, FCV-LUZ, n.6, p. 491-499, 2004.
- Andréa, M. & Bezerra, R.F., 2013. FISH LECTINS : A BRIEF REVIEW. , 5.
- Araripe, J. et al., 2013. Dispersal Capacity and Genetic Structure of *Arapaima gigas* on Different Geographic Scales Using Microsatellite Markers. *PLoS ONE*, 8(1).
- Araujo-Lima, C.A.R.M.; Gomes, L.C. Tambaqui (*Colossoma macropomum*) In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. (Eds). *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Santa Maria: UFSM, 2005. p. 67-104.
- ABBOTT, S. L. et al. The Genus *Aeromonas* : Biochemical Characteristics , Atypical Reactions , and Phenotypic Identification Schemes The Genus *Aeromonas* : Biochemical Characteristics , Atypical Reactions , and Phenotypic Identification Schemes. 2003.
- ALURU, N.; VIJAYAN, M. M. Stress transcriptomics in fish: a role for genomic cortisol signaling. **General and comparative endocrinology**, v. 164, n. 2-3, p. 142–50, 2009.
- ANDRADE, N. et al. Antimicrobiana in Vitro De Extratos Etanólicos De Própolis De Três Estados Brasileiros Sobre *Aeromonas hydrophila*. **Arq. Inst. Biol.**, v. 79, p. 9–15, 2012.
- ARARIPE, J. et al. Dispersal Capacity and Genetic Structure of *Arapaima gigas* on Different Geographic Scales Using Microsatellite Markers. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.
- ARDÓ, L. et al. Immune responses of resistant and sensitive common carp families following experimental challenge with *Aeromonas hydrophila*. **Fish & shellfish immunology**, v. 29, n. 1, p. 111–6, jul. 2010.
- BALAKRISHNA, K.; MURALI, H. S.; BATRA, H. V. Detection of toxigenic strains of *Aeromonas* species in foods by a multiplex PCR assay. **Indian journal of microbiology**, v. 50, n. 2, p. 139–44, jun. 2010.
- BARTON, B. A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and comparative biology**, v. 42, p. 517–525, 2002.

BEAZ-HIDALGO, R.; FIGUERAS, M. J. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. **Journal of fish diseases**, v. 36, n. 4, p. 371–88, abr. 2013.

BERNARDES¹, M. V. S. et al. AVALIAÇÃO DE TRÊS DIFERENTES SANITIZANTES EM VIVEIROS DE PISCICULTURA PELA CONTAGEM DE BACTÉRIAS DO GÊNERO AEROMONAS. **Ciencia Anamil Brasileira**, v. 4, n. 2, p. 69–83, 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRUSCOLINI, F. et al. A multi-approach study of influence of growth temperature and nutrient deprivation in a strain of *Aeromonas hydrophila*. **International journal of food microbiology**, v. 188, p. 1–10, 1 out. 2014.

BRYDGES, N. M. et al. Quantifying stress responses induced by different handling methods in three species of fish. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 116, n. 2-4, p. 295–301, jan. 2009.

BURR, S. E. et al. Heterogeneity of *Aeromonas* populations in wild and farmed perch, *Perca fluviatilis* L. **Journal of fish diseases**, v. 35, n. 8, p. 607–13, ago. 2012.

CARNEIRO, P. C. F.; URBINATI, E. C. Transport stress in matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae), at different densities. p. 221–229, 2002.

CHANDROO, K. .; DUNCAN, I. J. .; MOCCIA, R. . Can fish suffer?: perspectives on sentience, pain, fear and stress. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 86, n. 3-4, p. 225–250, jun. 2004.

CNAANI, A.; MCLEAN, E.; HALLERMAN, E. M. Reprint of: Effects of growth hormone transgene expression and triploidy on acute stress indicators in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**, v. 420-421, p. S124–S133, 2014.

CONTE, F. . Stress and the welfare of cultured fish. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 86, n. 3-4, p. 205–223, jun. 2004.

CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 55, p. 261–273, 1995.

DAIRIKI, J. K.; SILVA, T. B. A. Revisão de Literatura: Exigências Nutricionais do Tambaqui - Compilação de Trabalhos, Formulação de Ração Adequada e Desafios Futuros. **Documentos Embrapa**, p. 44, 2011.

DALLAIRE-DUFRESNE, S. et al. Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis. **Veterinary microbiology**, 9 jul. 2013.

EMBRAPA. **Noções básicas sobre piscicultura e cultivo em tanques-rede no Pantanal.** [s.l: s.n.].

FAO, F. The state of world fisheries and aquaculture. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, v. 2010, p. 218, 2010.

FISHERIES, F. A O.; AQUACULTURE, G. the Global Aquaculture Production Statistics for the year 2011. v. 2011, n. March, p. 2011–2013, 2013.

FREITAS, R. S. DE et al. Qualidade Da Agua E Perspectivas Para Gerenciamento Ambiental Dos Cultivos De. p. 116–126, 2014.

HIDALGO, R. B.; FIGUERAS, M. J. Molecular Detection and Characterization of Furunculosis and Other Aeromonas Fish Infections. In: **HEALTH AND ENVIRONMENT IN AQUACULTURE.** [s.l: s.n.].

IMAMICHI, Y.; YOKOYAMA, Y. Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lectin from the jellyfish *Nemopilema nomurai*. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 156, p. 12–18, 2010.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. **Clinical microbiology reviews**, v. 23, n. 1, p. 35–73, jan. 2010.

JOURNAL, B. The occurrence of. p. 126–131, 2011.

KUBITZA, F. Piscicultura Sustentável. **Panorama da aquicultura**, v. 20, n. 119, 2010.

KUMAR, S. et al. Effect of orally administered azadirachtin on non-specific immune parameters of goldfish *Carassius auratus* (Linn. 1758) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. **Fish & shellfish immunology**, v. 34, n. 2, p. 564–73, fev. 2013.

LEITE, L. V. et al. Determinação da dose inseminante e embriogênese na fertilização artificial de tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, p. 421–429, 2013.

LI, F. et al. Distribution, Virulence-associated genes and Antimicrobial Resistance of *Aeromonas* isolates from Diarrheal patients and Water, China. **Journal of Infection**, nov. 2014.

LI, Y.; CAI, S.-H. Identification and pathogenicity of *Aeromonas sobria* on tail-rot disease in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Current microbiology**, v. 62, n. 2, p. 623–7, mar. 2011.

LIMA, L. C. Doenças de importância econômica em piscicultura. **III Seminário de Aquicultura, Maricultura e Pesca Aquicultura**, p. 30–38, 2007.

LIMA, L. C. et al. Stress in fishes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 30, n. 3/4, p. 113–117, 2007.

- LINO, M. A. DA S. et al. FISH LECTINS : A BRIEF REVIEW. **Advances in Zoology Research**, v. 5, p. 95–114, 2013.
- MACIEL CARVALHO, E. V. M. et al. Detection of the first lectin with antimicrobial activity present in serum of the Amazonian fish tambaqui *Colossoma macropomum*. **Fisheries Science**, v. 78, p. 879–887, 2012.
- MAGNADÓTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 20, p. 137–151, 2006.
- MARTINS, M. L. et al. SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA C NA DIETA *Aeromonas caviae* DURING MORTALITY ON NILE TILAPIA AND SUPPLEMENTATION. v. 34, n. 4, p. 585–590, 2008.
- MENDONÇA, P. P.; UENF, D. R. Influência Do Fotoperíodo No Desenvolvimento De Universidade Estadual Do Norte Fluminense. 2007.
- MORGAN, K. N.; TROMBORG, C. T. Sources of stress in captivity. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 102, n. 3-4, p. 262–302, fev. 2007.
- MPA. Boletim estatístico da pesca e aquicultura. **Formación de la ciudadanía las TICs y los nuevos problemas**, p. 101, 2009.
- NARDOCCI, G. et al. Fish & Shellfish Immunology Neuroendocrine mechanisms for immune system regulation during stress in fish. v. 40, 2014.
- NAYAK, S. K. Fish & Shellfish Immunology Probiotics and immunity : A fish perspective. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 29, n. 1, p. 2–14, 2010a.
- NAYAK, S. K. Probiotics and immunity: a fish perspective. **Fish & shellfish immunology**, v. 29, n. 1, p. 2–14, jul. 2010b.
- NUNES, CAVERO, B. A. S.; PEREIRA-FILHO, M.; ROUBACH, R. Enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de tambaqui. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 41, n. 1, p. 139–143, 2006.
- OSTRENSKY, A.; BOEGER, W. **Piscicultura - Fundamentos e Técnicas de Manejo**. [s.l: s.n.].
- PALUMBO, S. A et al. Starch-Ampicillin Agar for the Quantitative Detection of *Aeromonas hydrophila*. **Applied and environmental microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1027–30, out. 1985.
- PARKER, J. L.; SHAW, J. G. *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. **The Journal of infection**, v. 62, n. 2, p. 109–18, fev. 2011.
- PEIXOTO, L. J. S.; GORDIANO, L. A.; COSTA, M. M. e perfis DE AEROMONAS SPP .: FATORES DE VIRULÊNCIA E PERFIS DE. p. 453–461, 2012.

- PEREIRA, C. S. et al. *Aeromonas* spp . E *Plesiomonas shigelloides* ISOLADAS A PARTIR DE MEXILHÕES (*Perna perna*) IN NATURA E PRÉ-COZIDOS NO RIO DE JANEIRO , RJ 1. v. 24, n. 4, p. 562–566, 2004.
- PICCOLI, R. H.; CÉSAR, H.; FIGUEIREDO, P. Identificação e Resistência a Antimicrobianos de Espécies de *Aeromonas* Móveis Isoladas de Peixes e Ambientes Aquáticos. **Ciência e Agrotécnologia**, v. 30, n. 6, p. 1211–1217, 2006.
- POOBALANE, S. et al. Protein expression by *Aeromonas hydrophila* during growth in vitro and in vivo. **Microbial pathogenesis**, v. 45, n. 1, p. 60–9, jul. 2008.
- RAMOS, I. P. et al. Impactos ambientais de pisciculturas em tanques- rede sobre águas continentais brasileiras : revisão e opinião. 2010.
- REYES-BECERRIL, M.; ANGULO, C.; ASCENCIO, F. Humoral immune response and TLR9 gene expression in Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) experimentally exposed to *Aeromonas veronii*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 42, n. 2, p. 289–296, 2015.
- RODRIGUES, A. NUTRIÇÃO E ALIMENTAÇÃO DO TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) NUTRITION AND FEEDING OF TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 40, n. 1, p. 135–145, 2014.
- ROUSSEFF, D. V. AQUICULTURA. 2011.
- SAHOO, P. K. et al. Family association between immune parameters and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection in the Indian major carp, *Labeo rohita*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 25, p. 163–169, 2008.
- SANTOS, E. F. et al. 544. Fauna parasitária de tambaqui *Colossoma macropomum* (Characidae) cultivado em tanque-rede no estado do Amapá, Amazônia oriental. **Acta Amazonica**, v. 43, n. 1, p. 105–112, 2013.
- SCHRECK, C. B. Stress and fish reproduction: the roles of allostasis and hormesis. **General and comparative endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 549–56, 1 fev. 2010.
- SCHRECK, C. B.; CONTRERAS-SANCHEZ, W.; FITZPATRICK, M. S. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. **Aquaculture**, v. 197, n. 1-4, p. 3–24, jun. 2001.
- SOUZA, R. A. DE et al. Análise econômica da criação de tambaqui em tanques-rede : estudo de caso em assentamento da reforma agrária. p. 253–268, 2014.
- TAM, B.; GOUGH, W. A.; TSUJI, L. The Impact of Warming on The Appearance of Furunculosis in Fish of The James Bay Region, Quebec, Canada. **Regional Environmental Change**, v. 11, p. 123–132, 2011.
- TAVARES-DIAS, M. **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. [s.l.: s.n.].

TORT, L. Stress and immune modulation in fish. **Developmental and comparative immunology**, v. 35, n. 12, p. 1366–75, dez. 2011.

VAN MUISWINKEL, W. B.; NAKAO, M. A short history of research on immunity to infectious diseases in fish. **Developmental and comparative immunology**, 27 ago. 2013.

VASTA, G. R. et al. Structural and functional diversity of the lectin repertoire in teleost fish: Relevance to innate and adaptive immunity. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, n. 12, p. 1388–1399, 2011.

VERBURG-VAN KEMENADE, B. M. L. et al. **Fish Neuroendocrinology**. [s.l.] Elsevier, 2009. v. 28

WAHLI, T. et al. *Aeromonas sobria*, a causative agent of disease in farmed perch, *Perca fluviatilis* L. **Journal of Fish Diseases**, v. 28, p. 141–150, 2005.

WEBER, E. S. Fish analgesia: pain, stress, fear aversion, or nociception? **The veterinary clinics of North America. Exotic animal practice**, v. 14, n. 1, p. 21–32, jan. 2011.

Zimmermann, S. 2001. Estado atual e tendências da moderna aquicultura.

Capítulo 1: Artigo a ser submetido a revista " The Scientific World Journal"

Site da revista: <http://www.hindawi.com/journals/tswj/>

Regras da publicação: <http://www.hindawi.com/journals/tswj/guidelines/>

Influence stress confinement on the bacterial population in the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*) and changes in serum lectin levels to a bacterial challenge.

D.S.C. Marques^a, D.A. Ferreira^b, P.M.G. Paiva^a, T.H. Napoleão^a, J.M. Araújo^c, E.V.M. Maciel Carvalho^a and L.C.B.B. Coelho^a

^aDepartamento de Bioquímica, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

^bEstação de Aquicultura Continental Professor Johei Koike, DEPAq, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

^cDepartamento de Antibióticos, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

This work was supported by the Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco

D.S.C. Marques - Diego Santa Clara Marques – Rua Manoel Lubambo nº144 – 55 81
998984661 – diego.scm@hotmail.com

Abstract

This work reports for the first time the identification of *Aeromonas* species colonizing gills of juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*) submitted or not to a confinement stress. In addition, we evaluated possible changes in the serum levels of lectins (carbohydrate-binding proteins that are components of fish immune system) in juveniles submitted to a challenge using two of the *Aeromonas* strains isolated. Homogenates of gill tissues from stressed fishes contained a higher number of bacterial colony-forming units in comparison with unstressed fishes. A total of 72 *Aeromonas* strains were isolated being 97% from stressed fishes. Among these, 63 were identified at species level and six were classified as atypical *Aeromonas* strains. The most prevalent species were *A. bestiarum* and *A. caviae* and thus strains of them were used in bacterial challenges. There was a remarkable increase in lectin serum levels 24 h after infection with *A. bestiarum*; however, no significant increase was found for treatment with *A. caviae*. In conclusion, *C. macropomum* gills are susceptible to colonization by different *Aeromonas* species, mainly at confinement stressful conditions, and serum lectins may have a role in the acute immunological response towards infection by *A. bestiarum*.

Keywords: *Aeromonas bestiarum*; bacterial fish disease; *Colossoma macropomum*; immunological challenge; lectin.

1. Introduction

Colossoma macropomum (known as tambaqui or black pacu) is among the most cultivated species in tropical countries and is the second most cultivated in Brazil, with a good standard of growth and meat quality, achieving high rates of commercial acceptance [1]. It has been introduced in other tropical countries in both Africa and Asia.

The pollution of aquatic environments combined with overfishing, are threats to conservation of fish species [2-4]. Pollutants change the dynamics of aquatic environments, reducing oxygen levels, alter the pH and temperature of the water causing deaths and endangering the natural fish populations [5-7].

Stress is the main cause of the emergence of diseases in fish farms. The study of the cause and the impact of stress on the physiology and fish health has been the goal of scientific's research's [8-9]. Chronic stress leads to various metabolic and behavior changes in fish, with serious consequences for immune function, triggering the appearance of diseases [10].

Among the diseases, bacterial infections is a main cause of death of fish in captivity [11]. The bacteria belonging to the genus *Aeromonas* are common causative agents of serious diseases usually linked to strong losses in aquaculture production and their taxonomy has a close relationship with ictiopathology aspects [12-14]. An increased density of *Aeromonas* in aquatic environment represents a great danger for fishes due to the high virulence of these bacteria [15].

The *Aeromonas* species possess several virulence factors such as the toxin aerolysin, cytotoxic and cytotoxic enterotoxins, proteases and DNAses [15,16]. They are responsible for furunculosis (a disease caused by *A. salmonicida* that primarily

affects salmonids), ulcer diseases, and several types of septicemia, which are referred as Motile Aeromonas Septicemia (MAS), who is the cause great loses in aquaculture [17-19]. These microorganisms are present as part of the natural microbiota but cause diseases when occur damages to immune system or physiological changes resulting from the effects of acute and chronic stress [20,21].

The innate immunity of fish is remarkably involved with the responses to unfavorable environmental conditions. Lectins are proteins that bind carbohydrates specifically and reversibly and have shown antimicrobial activity [22,23]. They play an important role in the fish innate immune response by recognizing carbohydrates expressed by pathogens; the lectins act as opsonins stimulating the phagocytosis and the microorganism lysis by the complement system [24,25]. The serum of tambaqui contains a lectin named ComaSeL (*Colossoma macropomum* Serum Lectin) with antimicrobial activity against pathogens of freshwater fishes [1].

The present work reports the isolation of *Aeromonas* colonies found in gills of tambaqui juvenile fishes submitted or not to a confinement stress, and their taxonomic identification; in addition, it was evaluated whether there are changes in the serum lectin levels in fishes submitted to an immunological challenge using two of the *Aeromonas* strains isolated.

To our knowledge there are no studies on the identification of *Aeromonas* species that colonize the tambaqui. Also, this work reports the evaluation of serum lectin level changes in response to *Aeromonas* infection. In this sense, this work reports relevant information for future studies on bacterial diseases caused by *Aeromonas* in this fish species.

2. Materials and methods

2.1 Animals and stress induction

The fishes used in the experiments were reared at the *Estação de Aquicultura Continental Professor Johei Koike* of the *Departamento de Pesca e Aquicultura* from the *Universidade Federal Rural de Pernambuco*. Six juvenile tambaquis were used, divided into two groups: confinement stressed (n=3) and unstressed (n=3). In the first group, the fishes were confined, with water slide at the same level of the fish's back, for 96 h while in the second group the fishes were maintained during this same period in fishponds with standard water depth. The fish were sacrificed in an ice bath and gill tissue samples were set aside for later recovery of *Aeromonas* sp.

2.2 Isolation of *Aeromonas* colonies

The gill tissues were macerated in sterile peptone water 0,1% (1:10, w/v) using tissue grinders. Next, a serial ten-fold dilution of the homogenates was performed in peptone water until 1:10,000. Ten microliters of each dilution were smeared in petri plates containing the media SAA (Starch-Ampicillin Agar), SA (Starch Agar) or TSA (Trypticase Soy Agar, DifcoTM). The plates were incubated at 30°C for 48 h.

After the incubation period, the number of CFU (Colony Forming Units) in each plate was counted. The plates with a number CFU from 30 to 300 were used for CFU counts / g of gill tissue and for isolating colonies of *Aeromonas*. From each plate, five

colonies were selected with the presumptive features for *Aeromonas*: yellow halo around the colony in the cases of SAA and SA plates [26], or a dark beige and brilliant colony in the case of TSA plate.

2.3 Biochemical identification

The selected colonies were purified by repeated streaking in Petri dishes containing the medium used in isolation. After purification, each strain was subcultured on TSA inclined medium and incubated at 30°C for 24 h. For identification at genus level, it was initially performed the gram staining. Gram-negative bacteria with short-rod or coco-rod shapes, isolated or paired, were submitted to the following tests: 3% potassium hydroxide (KOH), oxidase, catalase, growth in broth with 6% NaCl and growth on Triple Sugar Iron (TSI) medium. Strains confirmed as gram-negative by KOH test, mobile or sessile, positive for oxidase and catalase production, not able to grow in medium containing 6% NaCl and showing fermentative or fermentative/oxidative metabolism in TSI were considered to belong to *Aeromonas* genus [18,27].

All colonies confirmed as *Aeromonas* were submitted to the following biochemical tests for identification at species level: hydrolysis of esculin and arginine, indole production, yield of acetoin from glucose (VP), gas production from glucose, ability to use arabinose and sucrose, lysine and ornithine decarboxylation, motility in semi-solid agar and Voges-Proskauer and methyl red tests (MR-VP). All these assays were performed following the standar methodology's [28]. Next, the colonies that showed the same results in all tests were grouped.

The groups that showed until 77.78% of similarity between the biochemical profile and the characteristics of an *Aeromonas* species described in the *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* [29] were classified in this taxon. Groups that showed variations of at least three biochemical tests were classified as atypical *Aeromonas*. Table 2 summarizes the identification criteria for each species according to the biochemical assays.

2.4 Immunological challenge towards infection by *Aeromonas*

Two strains of *Aeromonas* species isolated from stressed fishes and identified as described above were used for the challenge experiment: *A. bestiarum* (named E1/17) and *A. caviae* (named E3/23). Thirty six juvenile fishes with average weight of 410 ± 40 g and length of 25 ± 2 cm were divided into three groups, each one with 12 animals: treatment 1 (challenged with E1/17), treatment 2 (challenged with E3/23) and control (unchallenged). The infection was performed by injecting intraperitoneally 1 mL of a suspension containing 1.5×10^8 CFU of bacteria; in the control group it was injected 1 mL of saline (0.9% NaCl). Blood samples were collected via the tail vein at times 0, 24, and 48 h, being the fishes anaesthetized with benzocaine (186 mg/L) bath. The collected blood was allowed to stand for about 3 h and then centrifuged (1,500 g, 5 min, 4°C). The serum (supernatant) was separated in aliquots of 2 mL and stored at -20°C.

2.5 Protein concentration and hemagglutinating activity

Protein concentration in serum samples was estimated according to Bradford (1976). Lectin activity was evaluated by determining the hemagglutinating activity

(HA) [29]. Lectin serum levels were expressed as specific HA, which was calculated by the ratio between HA and protein concentration (mg/mL).

2.6 Statistical analysis

The data were expressed as a mean of replicates $\pm$ standard errors. One way fixed-effects ANOVA (significance at $p < 0.05$) was conducted using the Action 2.8.29.357.515 software. Significant differences between the results from challenge treatments were analyzed using Tukey's test (significance at $p < 0.05$) using the same software.

3. Results and discussion

Homogenates of gill tissues from fishes submitted to confinement stress contained a higher number of CFU in comparison with those from unstressed fishes (Table 1). A total of 135 colonies with *Aeromonas* presumptive features were isolated from stressed fishes and 17 from unstressed fishes. Biochemical assays confirmed 70 colonies from stressed fishes and 2 from unstressed fishes as belonging to the genus *Aeromonas*. According to the biochemical tests, 63 of these 72 colonies were identified at species level, six were classified as atypical *Aeromonas* strains, and three remained undefined since they could not be classified into a single taxon. Figure 1 shows this distribution as well as the most frequent species.

The highest density of *Aeromonas* in gills of stressed fishes showed that the confinement stress is able to favor the rapid proliferation of these bacteria in *C.*

macropomum; *A. bestiarum* was the species with highest occurrence in stressed juvenile fish. It is reported that this opportunist bacteria may act as a reservoir of resistance genes for fresh water bacteria and thus has a high virulence power [30]. *A. bestiarum* is also responsible for a broad spectrum of fish diseases, including hemorrhagic septicemia [31]. *A. caviae* was found as the main bacteria present in the surface and the intestinal tract of *Oreochromis niloticus* fishes available in a Nigerian market and the strains isolated were resistant to several antibiotics [32].

The lectins exert an immunological function in fish identifying pathogens and marking them for phagocytosis and lysis. It was reported that the lectin present in serum of tambaqui, *Colossoma macropomum* (ComaSeL) shows in vitro antimicrobial activity [1]. In order to investigate whether *C. macropomum* serum lectins would be involved in the response of juvenile fishes to *Aeromonas* infection we submitted the animals to an immunological challenge using two isolated strains belonging to the most abundant species. The results can be seen in Figure 2.

The lectin serum levels after 24 h were significantly ($p < 0.05$) different among all treatments. In comparison with time zero, there was a high increase ($p < 0.05$) in the serum lectin level in fishes challenged with *A. bestiarum* while no significant differences ($p > 0.05$) were found for fishes from treatment with *A. caviae*; in control treatment, the lectin serum increased ($p < 0.05$) but considerably less than in *A. bestiarum* treatment. This result can be connected to a specificity of the tambaqui serum lectins in recognizing pathogens microorganisms suggesting that these components of the immune system respond differently to infection by different species of *Aeromonas*.

There was an increase in the lectin level in control and *A. caviae* treatments after 48 h, in comparison with the previous period; on the other hand, the serum lectin level in fishes treated with *A. bestiarum* decreased. However, at this time there were no

longer significant differences ($p > 0.05$) between the serum lectin levels in fishes from all treatments and control (Figure 2). This suggests that *C. macropomum* serum lectins are probably part of an acute response of the fish immune system against *A. bestiarum*, since there was a peak of serum lectin level at 24 h of challenge.

The entry of *Aeromonas* species into fish body has been reported to elicit alterations in the expression of several immunological molecules. For example, a challenge with *A. salmonicida* in *Salmo salar* fishes resulted in increase of lysozyme and alkaline phosphatase activities in serum, mucus and skin while the level of antioxidant agents (superoxide dismutase, peroxidase and catalase) decreased [33]. The infection with *A. hydrophila* was able to alter the transcriptome profile in *Megalobrama amblycephala* [34]. Similarly to our results, the activity of a serum lectin from *Trichogaster trichopterus* enhanced in response to *A. hydrophila*, inducing phagocytosis activating the complement [35].

4.0 Conclusion

The pressure exerted by confinement stress becomes the gills of juvenile *C. macropomum* more susceptible to colonization by *Aeromonas* species, especially *A. bestiarum* and *A. caviae*, which are reported to cause severe infections and septicemia in fishes. Bacterial challenge experiments suggested that serum lectins are involved in the acute immune response of the fishes towards infection by *A. bestiarum*. The tambaqui has a great market expansion potential. The inland fisheries is not sufficient to meet the growing demand for fish, and overfishing threatens the natural populations [4].

The knowledge of the stress effect on the population of potentially pathogenic bacteria in tambaqui and lectins profile present in the serum of these fish will support the development of technical procedures for the prevention and treatment of bacterial diseases affecting production. These improvements will encourage its cultivation in

captivity, discouraging extractive fishing, increasing its economic importance and contributing to the preservation of natural populations.

Acknowledgments

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) for research grants and fellowships (PMGP and LCBBC). We are also grateful to the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE), and the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) for financial support. DSCM would like to thank FACEPE for graduate scholarship.

References

- [1] Maciel Carvalho EVM, Bezerra RF, Bezerra RS, Araújo JM, Santos AJG, Correia, MTS, Coelho LCB. Detection of the first lectin with antimicrobial activity present in serum of the Amazonian fish tambaqui *Colossoma macropomum*. Fisheries Sci. 2012;78: 879-887.
- [2] Owusu-Agyeman I, Malovanyy A, Plaza E. Pre-concentration of ammonium to enhance treatment of wastewater using the partial nitrification/anammox process. Environ Technol. 2014;36(10): 1256-1264.
- [3] Lotti T, Kleerebezem R, Hu Z, Kartal B, Kreuk MK, Kip C van Erp Taalman, Kruit J, Hendrickx TLG, van Loosdrecht MCM. Pilot-scale evaluation of anammox-based mainstream nitrogen removal from municipal wastewater. Environ Technol. 2014; 36(9): 1167-1177.

- [4] Casstello L, Mcgrath D, Beck P. Resource sustainability in small-scale fisheries in the Lower Amazon floodplains. *Fish Resch.* 2001; 110(2); 356-364.
- [5] Zhong H, Liu F, Lu J, yang w, Zhao C. Effect of diesel leakage in circulating cooling water system on preponderant bacteria diversity and bactericidal effect of biocides. *Environ Technol.* 2014;36(9): 1147-1159
- [6] Hwan Y, Kim D, Shin HS. Inhibition of nitrate reduction by NaCl adsorption on a nano-zero-valent iron surface during a concentrate treatment for water reuse. *Environ Technol.* 2014; 36(9): 1178-1187.
- [7] Tang M, Zhang f, Yao S, Liu Y, Chen J. Application of *Pseudomonas flava* WD-3 for sewage treatment in constructed wetland in winter. *Environ Technol.* 2014; 36(9): 1205-1211.
- [8] Bezerra RF, Soares MCF, Santos AJG, Carvalho EVMM, Coelho LCBB. Seasonality Influence on Biochemical and Hematological Indicators of Stress and Growth of Pirarucu (*Arapaima gigas*), an Amazonian Air-Breathing Fish. *The Scien W. Journal.* 2014;2014: 1-6.
- [9] Weber ES. Fish Analgesia: Pain, Stress, Fear Aversion, or Nociception?. *The vet clin N. America.* 2011;14: 21-32.
- [10] Tort L. Stress and immune modulation in fish. *Dev Comp Immunol.* 2011; 35: 1366–1375.
- [11] Austin B, Austin DA. Bacterial fish pathogens, disease of farmed and wild fish. Chichester: Springer-Praxis; 2007.
- [12] Abbott SL, Cheung WK, Janda JM. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 2348–2357.

- [13] Dallaire-Dufresne S, Tanaka KH, Trudel MV, Lafaille A, Charette SJ. Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis. *Vet Microbiol.* 2014;169: 1-7.
- [14]] Li F, Wang W, Zhu Z, Chen A, Du P, Wang R, Chen H, Hu Y, Li J, Kan B, Wang D. Distribution, virulence-associated genes and antimicrobial resistance of *Aeromonas* isolates from diarrheal patients and water, China. *J Infect.* 2014; 70(6): 1-9.
- [15] Hu M, Wang N, Pan ZH, Lu CP, Liu YJ. Identity and virulence properties of *Aeromonas* isolates from diseased fish, healthy controls and water environment in China. *Lett Appl Microbiol.* 2012; 55: 224-233.
- [16]] Duarte AS, Cavaleiro E, Pereira C, Merino S, Esteves AC, Duarte EP, Tomás JM, Correia AC. *Aeromonas piscicola* AH-3 expresses an extracellular collagenase with cytotoxic properties. *Lett Appl Microbiol.* 2015; 60: 288-297.
- [17] Ardó L, Jeney G, Jeney Z. Immune responses of resistant and sensitive common carp families following experimental challenge with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shell Immunol.* 2010;29: 111–116.
- [18] Janda JM, Abbott SL. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity and infection. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23: 35–73.
- [19] Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. . 2013;36: 371–388.
- [20] Wahli T, Burr SE, Pugovkin D, Mueller O, Frey J. *Aeromonas sobria* , a causative agent of disease in farmed perch , *Perca fluviatilis* L. *Jour of Fish Diseases.* 2005; 28: 141-150.

- [21] Tam B, Gough WA, Tsujl L. Impact of Warming on The Appearance of Furunculosis in Fish of The James Bay Region, Quebec, Canada. *Reg Env Change*. 2011; 11: 123-132.
- [22] Oliveira MDL, Andrade NS, Santos-Magalhães NS, Coelho LCBB, Teixeira JA, Carneiro-da-Cunha MG, Correia, MTS. Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. *Lett Appl Microbiol*. 2008; 46: 371-376.
- [23] Ferreira RS1, Napoleão TH, Santos AF, Sá RA, Carneiro-da-Cunha MG, Moraes MM, Silva-Lucca RA, Oliva ML, Coelho LC, Paiva PM. Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from *Moringa oleífera*. *Lett in Appl microbiol*. 2011; 53(2): 186-192.
- [24] Vasta, GR, Nita-Lazar M, Giomarelli B, Ahmed H, Du S, Cammarata M, Parrinello N, Bianchet MA, Amzel LM. Structural and functional diversity of the lectin repertoire in teleost fish: Relevance to innate and adaptive immunity. *Dev Comp Immunol*. 2011;35: 1388–1399.
- [25] Lino MAS, Bezerra RF, Silva CDC, Maciel Carvalho EVM, Coelho LCBB. Fish lectins: A brief review. In *Advances in Zoology Research*. 2013;5: 95–114.
- [26] Palumbo SA, Maxino F, Williams AC, Buchanan RL, Thayer DW. Starch-ampicilin agar for the quantitative detection of *Aeromonas hydrophila*. *Appl Environ Microbiol*. 1985;50: 1027-1030.
- [27] Koneman, E. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
- [28] Martin-Carnahan A, Joseph SW. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, part B; 2005.

- [29] Correia MTS, Coelho LCBB. Purification of a glucose/ mannose specific lectin, isoform 1, from seeds, of *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean). Appl Biochem Biotech. 1995;55: 261–273.
- [30] Gordon L, Cloeckaert A, Doublet B, Schwarz S, Bouju-Albert A, Ganière JP, Bris HL, Matéos ALF, Giraud E. Complete sequence of the floR-carrying multiresistance plasmid pAB5S9 from freshwater *Aeromonas bestiarum*. J Antimicrob Chemother. 2008;62: 65–71.
- [31] Turska-Szewczuk A, Kozinska A, Russa R, Holst O. The Structure of the O-Specific Polysaccharide from the Lipopolysaccharide of *Aeromonas Bestiarum* Strain 207. Carb Resch. 2010; 245(5): 680-684.
- [32]] Ashiru AW, Uaboi-Egbeni PO, Oguntowo JE, Idika CN. Isolation and antibiotic profile of *Aeromonas* species from tilapia fish (*Tilapia nilotica*) and catfish (*Clarias betrachus*). Pak J Nutr. 2011;10: 982-986.
- [33] Du Y, Yi M, Xiao P, Meng L, Li X, Sun G, Liu Y. The impact of *Aeromonas salmonicida* infection on innate immune parameters of Atlantic salmon (*Salmo salar* L). Fish Shellfish Immunol. 2015;44: 307-316.
- [34] Tran NT, Gao ZX, Zhao HH, Yi SK, Chen BX, Zhao YH, Liu XQ, Wang WM. Transcriptome analysis and microsatellite discovery in the blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) after challenge with *Aeromonas hydrophila*. Fish Shellfish Immunol. 2015;45(1): 72-82.
- [35] Fock WL, Chen CL, Lam T.J, Sinfl YM. Roles of an endogenous serum lectin in the immune protection of blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallus) against *Aeromonas hydrophila*. Fish Shellfish Immunol. 2001;11: 101-103.

Figure captions

Fig. 1. Distribution per species of *Aeromonas* strains found in gill tissues of *Colossoma macropomum* submitted or not to confinement stress. Only two colonies were isolated from unstressed fishes, belonging to the species *A. popoffi*.

Fig. 2. Variations in serum lectin levels in juvenile *Colossoma macropomum* challenged with an intraperitoneal injection of *Aeromonas bestiarum* and *Aeromonas caviae* strains isolated from confinement stressed fishes. The serum lectin level was expressed as the specific hemagglutinating activity of sera collected at time zero and after 24 h and 48 h post-infection. In control, saline solution was injected in the fishes.

Table 1. Number of bacterial colonies in homogenates of gills from *Colossoma macropomum* submitted or not to confinement stress.

Culture medium	Bacterial CFU per g of gill tissue	
	Unstressed fishes	Stressed fishes
Starch-Ampicillin Agar	ND	1.95×10^5
Starch Agar	2.16×10^2	6.26×10^4

Table 2. Classification by specific biochemical assays of *Aeromonas* species found in this work colonizing *Colossoma macropomum* gills.

Species	Biochemical assays									
	BE	VP	MO	IND	ARG	ORN	LYS	SAC	ARA	G.C
<i>A. bestiarum</i>	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+
	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+

	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
<i>A. caviae</i>	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-
	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-
<i>A. popoffi</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+
	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+
<i>A. encheleia</i>	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
<i>A. veronii</i> biovar sobria	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+
<i>A. encheleia</i> or <i>A. eucrenophila</i>	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+
<i>A. popoffi</i> or <i>A. veronii</i> biovar sobria	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+
Atypical strains	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-
	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+

BE: Bile esculin; VP =Voges-Proskauer; MO: motility; IND: indol production; ARG: arginin dihydrolase; ORN: ornithine decarboxylation; LYS: lysine decarboxylation; SAC: sucrose fermentation; ARA: arabinose fermentation; GG: gas production from glucose.

Figure 1

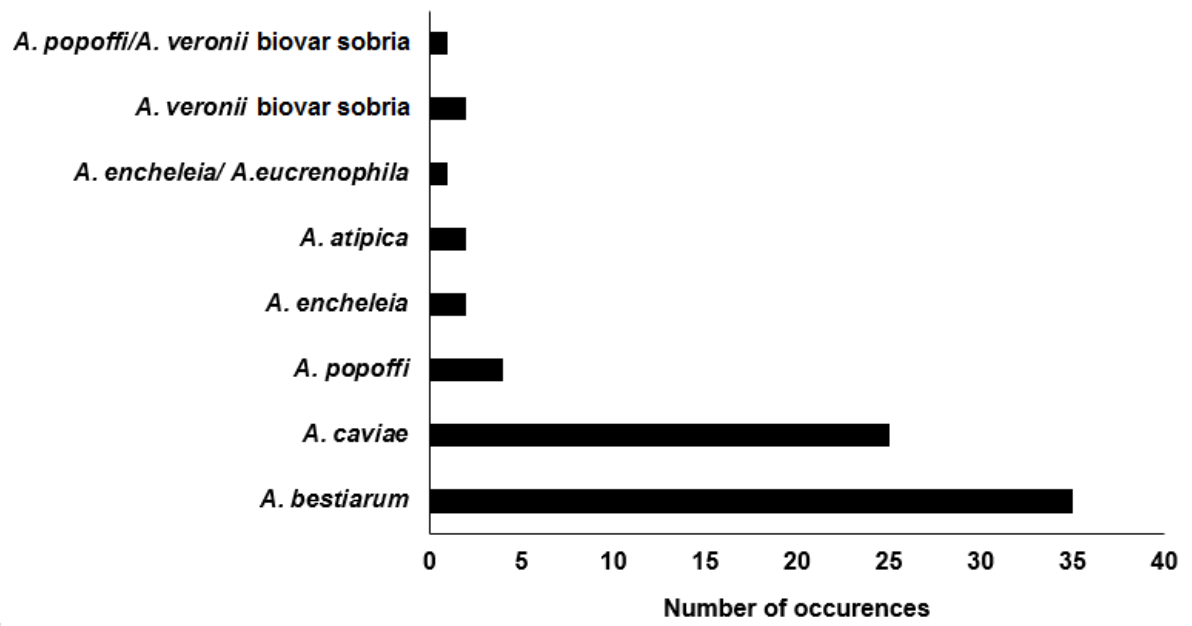
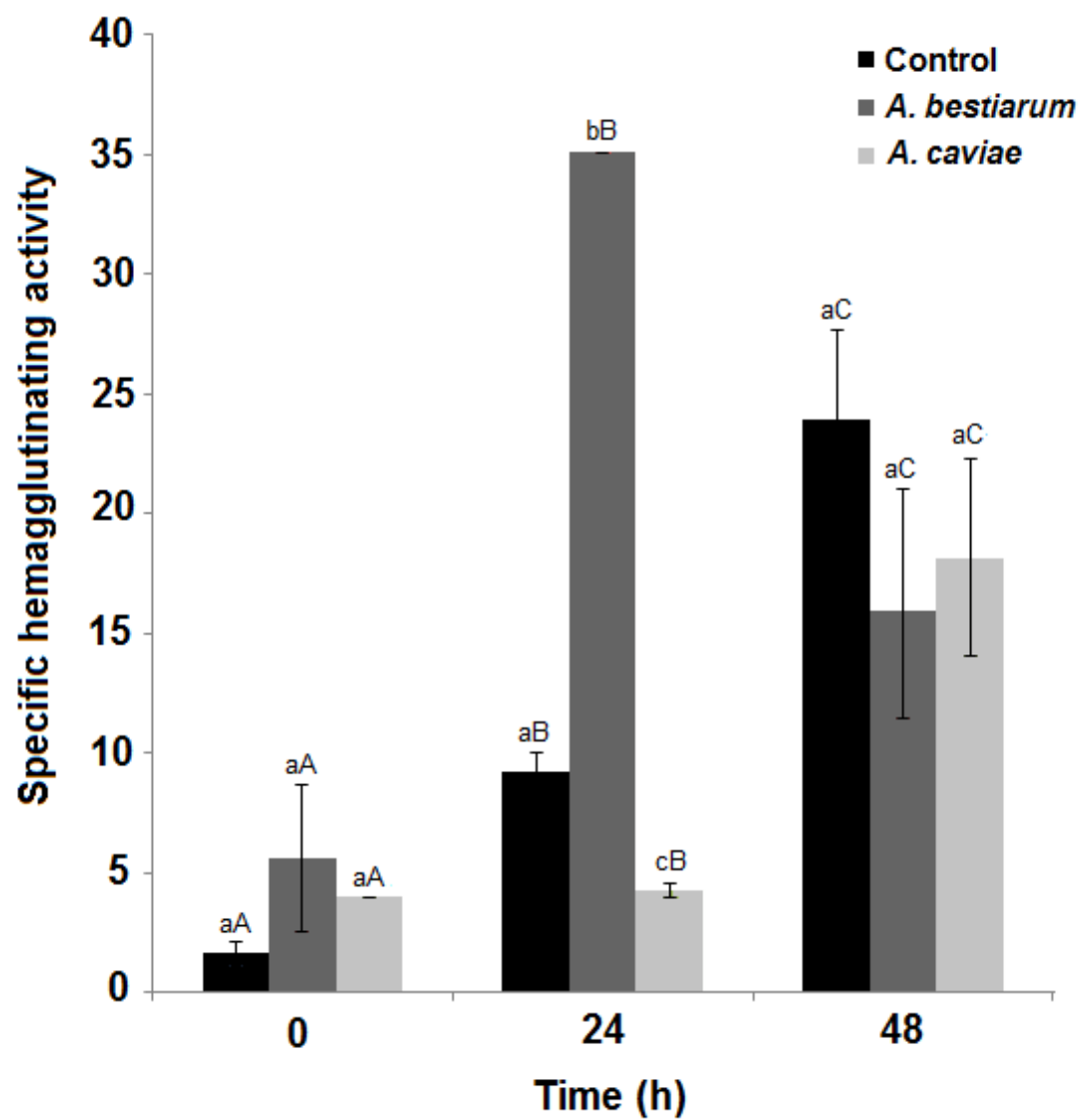


Figure 2



Anexo: guia de formatação de artigos da revista “The scientific World Journal”

Author Guidelines

Submission

Manuscripts should be submitted by one of the authors of the manuscript through the online [Manuscript Tracking System](#). Regardless of the source of the word-processing tool, only electronic PDF (.pdf) or Word (.doc, .docx, .rtf) files can be submitted through the MTS. There is no page limit. Only online submissions are accepted to facilitate rapid publication and minimize administrative costs. Submissions by anyone other than one of the authors will not be accepted. The submitting author takes responsibility for the paper during submission and peer review. If for some technical reason submission through the MTS is not possible, the author can contact tswj@hindawi.com for support.

Terms of Submission

Papers must be submitted on the understanding that they have not been published elsewhere and are not currently under consideration by another journal published by Hindawi or any other publisher. The submitting author is responsible for ensuring that the article's publication has been approved by all the other coauthors. It is also the authors' responsibility to ensure that the articles emanating from a particular institution are submitted with the approval of the necessary institution. Only an acknowledgment from the editorial office officially establishes the date of receipt. Further correspondence and proofs will be sent to the author(s) before publication unless otherwise indicated. It is a condition of submission of a paper that the authors permit editing of the paper for readability. All inquiries concerning the publication of accepted papers should be addressed to tswj@hindawi.com.

Peer Review

All manuscripts are subject to peer review and are expected to meet standards of academic excellence. If approved by the editor, submissions will be considered by peer-reviewers, whose identities will remain anonymous to the authors.

Microarray Data Submission

For any article that includes microarray data, this data should be deposited in an appropriate database such as Gene Expression Omnibus (GEO) or Array Express, and an entry name or accession number must be included in the manuscript prior

to its publication. Microarray data should be MIAME compliant. During the reviewing process, submitting authors are committed to provide the editor and the reviewers handling his/her manuscript with the login information by which they can access this information in the database.

Concurrent Submissions

In order to ensure sufficient diversity within the authorship of the journal, authors will be limited to having two manuscripts under review at any point in time. If an author already has two manuscripts under review in the journal, he or she will need to wait until the review process of at least one of these manuscripts is complete before submitting another manuscript for consideration. This policy does not apply to Editorials or other non-peer reviewed manuscript types.

Article Processing Charges

The Scientific World Journal is an open access journal. Open access charges allow publishers to make the published material available for free to all interested online visitors. For more details about the article processing charges of The Scientific World Journal, please visit the [Article Processing Charges](#) information page.

Units of Measurement

Units of measurement should be presented simply and concisely using System International (SI) units.

Title and Authorship Information

The following information should be included

- Paper title
- Full author names
- Full institutional mailing addresses
- Email addresses

Abstract

The manuscript should contain an abstract. The abstract should be self-contained and citation-free and should not exceed 200 words.

Introduction

This section should be succinct, with no subheadings.

Materials and Methods

This part should contain sufficient detail so that all procedures can be repeated. It can be divided into subsections if several methods are described.

Results and Discussion

This section may each be divided by subheadings or may be combined.

Conclusions

This should clearly explain the main conclusions of the work highlighting its importance and relevance.

Acknowledgments

All acknowledgments (if any) should be included at the very end of the paper before the references and may include supporting grants, presentations, and so forth.

References

Authors are responsible for ensuring that the information in each reference is complete and accurate. All references must be numbered consecutively and citations of references in text should be identified using numbers in square brackets (e.g., “as discussed by Smith [9]”; “as discussed elsewhere [9, 10]”). All references should be cited within the text; otherwise, these references will be automatically removed.

Preparation of Figures

Upon submission of an article, authors are supposed to include all figures and tables in the PDF file of the manuscript. Figures and tables should not be submitted in separate files. If the article is accepted, authors will be asked to provide the source files of the figures. Each figure should be supplied in a separate electronic file. All figures should be cited in the paper in a consecutive order. Figures should be supplied in either vector art formats (Illustrator, EPS, WMF, FreeHand, CorelDraw, PowerPoint, Excel, etc.) or bitmap formats (Photoshop, TIFF, GIF, JPEG, etc.). Bitmap images should be of 300 dpi resolution at least unless the resolution is intentionally set to a lower level for scientific reasons. If a bitmap image has labels, the image and labels should be embedded

Preparation of Tables

Tables should be cited consecutively in the text. Every table must have a descriptive title and if numerical measurements are given, the units should be included in the column heading. Vertical rules should not be used.

Proofs

Corrected proofs must be returned to the publisher within 2-3 days of receipt. The publisher will do everything possible to ensure prompt publication. It will therefore be appreciated if the manuscripts and figures conform from the outset to the style of the journal.

Copyright

Open Access authors retain the copyrights of their papers, and all open access articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided that the original work is properly cited.

The use of general descriptive names, trade names, trademarks, and so forth in this publication, even if not specifically identified, does not imply that these names are not protected by the relevant laws and regulations.

While the advice and information in this journal are believed to be true and accurate on the date of its going to press, neither the authors, the editors, nor the publisher can accept any legal responsibility for any errors or omissions that may be made. The publisher makes no warranty, express or implied, with respect to the material contained herein.

Disclosure Policy

A competing interest exists when professional judgment concerning the validity of research is influenced by a secondary interest, such as financial gain. We require that our authors reveal any possible conflict of interest in their submitted manuscripts.

If there is no conflict of interest, authors should state that “The author(s) declare(s) that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.”

Clinical Study

When publishing clinical studies, Hindawi aims to comply with the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) on trials registration. Therefore, authors are requested to register the clinical trial presented in the manuscript in a public trials registry and include the trial registration number at the end of the abstract. Trials initiated after July 1,

2005 must be registered prospectively before patient recruitment has begun. For trials initiated before July 1, 2005, the trial must be registered before submission.

International Commission on Zoological Nomenclature

When publishing papers which describe a new zoological taxon name, Hindawi aims to comply with the requirements of the International Commission on Zoological Nomenclature (ICZN). Therefore, for all papers that include the naming of a new zoological taxon, authors are requested to contact Zoobank, the online registration system for the International Commission on Zoological Nomenclature, to obtain a Life Science Identifier (LSID). Moreover, authors are requested to insert the following text in the “Materials and Methods” section, in a subsection to be called “Nomenclatural Acts”:

The new names contained in this article are available under the International Code of Zoological Nomenclature. This work and the nomenclatural acts it contains have been registered in ZooBank. Zoobank Life Science Identifier (LSID) for this publication is: urn:lsid:zoobank.org:pub: XXXXXXXX. The LSID registration and any associated information can be viewed in a web browser by adding the LSID to the prefix “http://zoobank.org/.”

Ethical Guidelines

In any studies that involve experiments on human or animal subjects, the following ethical guidelines must be observed. For any experiments on humans, all work must be conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (1964). Papers describing experimental work which carries a risk of harm to human subjects must include a statement that the experiment was conducted with the human subjects’ understanding and consent, as well as a statement that the responsible Ethical Committee has approved the experiments. In the case of any animal experiments, the authors must provide a full description of any anesthetic or surgical procedure used, as well as evidence that all possible steps were taken to avoid animal suffering at each stage of the experiment.