

# AVALIAÇÃO DE TRÊS DIFERENTES SANITIZANTES EM VIVEIROS DE PISCICULTURA PELA CONTAGEM DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *AEROMONAS*

MÁRCIA VIRGÍNIA SANTOS BERNARDES<sup>1</sup>, ALBENONES JOSÉ DE MESQUITA<sup>2</sup>, IOLANDA APARECIDA NUNES<sup>2</sup>, PAULO CÉSAR SILVA<sup>2</sup>, EUNICE ROSABONI RIOS<sup>3</sup> E LARISSA RAQUEL SCHMALTZ MARQUES<sup>4</sup>

1. Médica Veterinária M.S. - Ministério da Agricultura.

2. Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás. C.P.131. CEP.74001-970. Goiânia-GO.

3. Médica Veterinária.

4. Zootecnista – Especialista em Zootecnia.

## RESUMO

Três diferentes sanitizantes – óxido de cálcio, formaldeído e biguanida polimérica – foram avaliados quanto à eficácia na sanitização de viveiros, durante o vazio sanitário, na estação do Setor de Piscicultura da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, no período de outubro de 1999 a março de 2000. Quatro tratamentos – T1-testemunha; T2- óxido de cálcio na proporção de 100 g/m<sup>2</sup>; T3-formaldeído a 5%; T4-biguanida polimérica a 1% – e três repetições compuseram o delineamento inteiramente casualizado. A espécie cultivada foi o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e cada viveiro foi povoado com 67 peixes. A eficácia dos sanitizantes foi avaliada através de análises bacteriológicas realizadas no Laboratório do Centro

de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, em amostras de sedimento do fundo dos viveiros e da água. Foi realizada a contagem de bactérias do gênero *Aeromonas* e observou-se diferença significativa a ( $P<0,05$ ), em relação à eficácia dos tratamentos, apenas na contagem de *Aeromonas* na água, no período 2, com melhor desempenho da biguanida polimérica. A contagem de bactérias do gênero *Aeromonas* no sedimento e na água revelou valores inferiores a 10<sup>3</sup> UFC/ml. Dentre os meios utilizados na fase de plaqueamento seletivo para *Aeromonas*, os ágaros tripticase de soja e amido ampicilina apresentaram melhor desempenho.

PALAVRAS-CHAVE: Sanitização de viveiros, *Piaractus mesopotamicus*, *Aeromonas*.

## SUMMARY

### EVALUATION OF THREE DIFFERENT DISINFECTANTS IN FISH PONDS ON THE COUNT OF BACTERIA OF THE GENUS *AEROMONAS*

Three different disinfectants – oxide of calcium, formaldehyde and biguanide polymeric – were appraised with relationship to the effectiveness in the disinfection of ponds, during the sanitary emptiness, in the station of the Section of Fish Farming of the Veterinary School of the Federal University of Goiás, in the period from October 1999 to March 2000. Four treatments – T1-control; T2-oxide of calcium 100g/m<sup>2</sup>; T3-formaldehyde 5%; T4-biguanide polymeric 1% – and three replicates were analyzed as a completely randomized design. The cultivated specie was the pacu (*Piaractus mesopotamicus*) being each pond with 67 fish. The effectiveness of the disinfectants was evaluated

through accomplished bacteriological analyses, in the laboratory of the Food Research Center of the Veterinary School of the Federal University of Goiás, in bottom sediment of the ponds and water samples. It was counted bacteria of the genus *Aeromonas*. Differences were observed differences ( $P<0,05$ ), in relation of the effectiveness of treatments, just in the count of *Aeromonas* in the water, but in the period 2, with better acting of biguanide polymeric. The count of bacteria of the genus *Aeromonas* in sediment and water showed lower than 10<sup>3</sup> UFC/ml. Among the means used in the selective phase for *Aeromonas*, the agars soy tripticase and starch ampicilin presented better performance.

KEY WORDS: Ponds disinfection, *Piaractus mesopotamicus*, *Aeromonas*.

## INTRODUÇÃO

No estudo das bactérias de peixes é necessário considerar vários fatores que intervêm de modo mais ou menos determinante no estabelecimento das infecções. Em primeiro lugar, é importante ressaltar que a maior parte das bactérias, como *Aeromonas* spp, constitui-se de organismos que fazem parte da microbiota bacteriana normal da água e é encontrada na superfície dos peixes e nas respectivas brânquias (CAHILL, 1990). Apesar disso, apenas em determinadas condições, entre elas altas densidades, baixa qualidade de água, que resultam no estresse a que os animais são submetidos, é que essas bactérias apresentam uma capacidade patogênica importante, manifestada por sintomatologia variada (PAVANELLI et al., 1997).

Isso significa que, se as condições da piscicultura forem boas, não haverá oportunidade para se desenvolverem até sua população se constituir em preocupação para o piscicultor (PAVANELLI et al., 1997).

É evidente, portanto, a necessidade de adoção de medidas profiláticas adequadas que possam minimizar o aparecimento das doenças, em que a sanificação dos tanques e viveiros antes do povoamento torna-se indispensável.

De acordo com POPOFF (1984), as bactérias pertencentes ao gênero *Aeromonas* são Gram-negativas e apresentam-se na forma de bastonetes retos com extremidades arredondadas, cujo comprimento varia de 1,0 a 3,0 mm e largura de 0,3 a 1,0 mm. Esses organismos podem ser encontrados isoladamente, em pares ou em cadeias curtas, e em sua maioria são móveis, pela presença de flagelo polar. O autor reuniu as bactérias do gênero *Aeromonas* em dois grupos, a saber: o primeiro, constituído por bactérias imóveis e psicotróficas, ao qual pertencem *Aeromonas salmonicida*; e o segundo, composto por bactérias móveis e mesófilas, ao qual pertencem *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* e *Aeromonas sobria*.

Além das espécies citadas anteriormente, outras foram identificadas fenotipicamente. As imóveis são *A. media* (ALLE et al., 1983) e *A. salmonicida* subespécie *smithia* (AUSTIN et al., 1989); e as móveis, *A. veronii* (HICKMAN-BRENNER et al.,

1987), *A. schubertii* (HICKMAN-BRENNER et al., 1988), *A. enteropelogenes* (SCHUBERT et al., 1990a), *A. ichthiosmia* (SCHUBERT et al., 1990b), *A. trota* (CARNAHAN et al., 1991a), *A. jandaei* (CARNAHAN et al., 1991b), *A. allosaccharophila* (MARTÍNEZ-MURCIA et al., 1992), *A. encheleia* (ESTEVE et al., 1995).

Conforme POPOFF (1984), a temperatura ótima de crescimento de *Aeromonas* spp é de 28 °C, embora possam multiplicar-se em extremos de 5°C e 41°C.

As características que podem diferenciar as espécies de *Aeromonas* incluem: hidrólise da esculina, crescimento em caldo KCN (cianeto de potássio), utilização da L- histidina, L-arginina, L-arabinose, fermentação da salicina, produção de gás a partir da glicose, e H<sub>2</sub>S (sulfeto de hidrogênio) a partir da cisteína (VON GRAEVENITZ, 1987).

Segundo POPOFF (1984), as *Aeromonas* móveis não crescem em caldo nutriente contendo 5% de NaCl. No entanto, DELAMARE et al. (2000), ao conduzirem estudo para avaliar o crescimento de dezesseis cepas de *Aeromonas* em diferentes concentrações de cloreto de sódio, observaram que todas as cepas de *Aeromonas* avaliadas, independente da espécie, cresceram na presença de 0,34 M (molar) de NaCl, e podem ser consideradas como halotolerantes. Doze das dezesseis cepas (75%) foram capazes de crescer na concentração de 0,51 M de NaCl. Nove cresceram no meio que continha 0,68 M de NaCl, e as espécies ATCC 49803 de *A. enteropelogenes* e ATCC 49657 de *A. trota* foram capazes de crescer no meio que continha 0,85 e 1,02 M de NaCl, respectivamente.

Quanto ao pH, KHANDORI & FAINSTEIN (1988) obtiveram crescimento na faixa de 5,5 a 9,0, entretanto observaram que a tolerância ao pH pela *Aeromonas* parece variar com a temperatura de incubação da cepa. PALUMBO et al. (1985b) relataram que em temperatura de incubação de 28°C, considerada ótima de crescimento, *Aeromonas* spp multiplicam-se bem em meios com pH variando de 6,5 a 7,2, porém, em pH 5,5, apresentam crescimento retardado.

SEIDLER et al. (1980), ao realizarem um estudo com o objetivo de enumerar e isolar bactérias

do gênero *Aeromonas*, na água e no sedimento de um rio situado no estado de Washington DC, Estados Unidos, observaram que a contagem de *Aeromonas* foi maior no período com a temperatura da água mais elevada. A contagem máxima obtida foi de  $4,0 \times 10^5$  UFC/g (grama) no caso do sedimento e 300 UFC/ml na água.

PATHAK et al. (1988), ao investigarem a distribuição sazonal de *Aeromonas hydrophila* em rios localizados na Índia, encontraram valores entre  $1,1 \times 10^3$  e  $1,6 \times 10^4$  UFC/100 ml, nos meses de fevereiro, março e abril. Esses valores foram similares aos encontrados por HAZEN et al. (1978), que, ao avaliarem ambientes aquáticos de água doce, encontraram  $1,3 \times 10^4$  UFC/100 ml, verificando, também, altas densidades em águas salinas com média de  $7,46 \times 10^4$  UFC/100 ml. KAPER et al. (1981) confirmaram esses dados, informando terem encontrado uma contagem máxima de  $5,0 \times 10^5$  UFC/100 ml em água mais quente.

POFFÉ & BEECK (1991) encontraram concentrações de *Aeromonas hydrophila* entre 104 e 106 UFC/ml em águas que recebiam esgotos, e uma média de 104 UFC/ml em efluentes secundários.

LEITÃO & SILVEIRA (1991) avaliaram a ocorrência de *Aeromonas* spp e *Plesiomonas shigelloides* na água, pescado e hortaliças, no estado de São Paulo, em um total de 103 amostras, compreendendo 58 de água e pescado de origem marinha e 45 de água e peixes de origem fluvial e hortaliças. *Aeromonas* spp foi confirmada em 77% das amostras analisadas, com índices de positividade de 100% em águas fluviais e moluscos, seguidos de peixes de origem fluvial e crustáceos marinhos, com 86,7% e 78,9% de positividade, respectivamente. A contagem mínima observada de *Aeromonas* spp em água de origem fluvial foi de 2,60 log UFC/ml e a máxima de 3,61 log UFC/ml. No caso de *Aeromonas hydrophila*, foram verificadas uma contagem mínima de 2,34 log UFC/ml e uma máxima de 3,27 log UFC/ml.

SUCHART et al. (1991) avaliaram a qualidade da água em viveiros contendo bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) e isolaram *Aeromonas hydrophila* com contagens que variavam de  $2 \times 10^2$  a  $9 \times 10^3$  UFC/ml, mas informaram que não observaram problemas de doenças nos peixes.

MESQUITA et al. (1995) examinaram um total de 53 amostras de produtos de origem animal e água de consumo provenientes da cidade de Goiânia, para verificar a presença de *Aeromonas* spp. Desse total, 14/53 (26,41%) das amostras foram positivas para *Aeromonas*. Os produtos crus apresentaram maior frequência de contaminação e contagens relativamente elevadas, e a maior foi verificada na carne suína,  $9,0 \times 10^5$  UFC/g. A espécie *Aeromonas hydrophila* foi a mais frequente (57,5%), seguida pelas espécies *Aeromonas veronii* (22,5%), *Aeromonas sobria* (17,5%) e *Aeromonas media* (2,5%). Nenhuma amostra de água de consumo, clorada ou não-clorada, mostrou-se positiva para *Aeromonas* spp.

MORAES (1994) citou que, além da água, há relatos de que *Aeromonas* spp foi isolada de peixes, frutos do mar, vegetais, embalagens e alimentos processados.

Alguns estudos comprovam a ocorrência de variação sazonal das espécies de *Aeromonas* spp. VON GRAEVENITZ & MENSCH (1968), ao realizarem estudo na Suíça, verificaram que a maioria dos casos clínicos ocorreu durante os meses de primavera e verão. KERSTERS et al. (1995) conduziram uma pesquisa na Bélgica e confirmaram a ocorrência de variação sazonal, e as maiores densidades de *Aeromonas* spp foram encontradas na água não-clorada durante os meses de verão. BURKE et al. (1984), na Austrália, em análise de amostras ambientais, verificaram pouca variação sazonal quanto à positividade para *Aeromonas* spp, mas com maior ocorrência no verão.

MORAES (1994) citou que a *Aeromonas* spp não é considerada um organismo de difícil cultivo, embora seu isolamento de outros microrganismos em uma microbiota normal de outro alimento e sua identificação sejam mais complexas.

ROSSI JÚNIOR (1998) comentou sobre a grande preocupação que passou a ser dispensada às bactérias do gênero *Aeromonas* spp, por serem capazes de estabelecer diferentes tipos de patogenias que acometem tanto animais como o homem. Dessa forma, microbiologistas das áreas de alimentos, ambiental e clínica avaliaram e desenvolveram técnicas e diferentes meios de cultura, que resultaram em

grande variedade de meios sólidos seletivos e caldos de enriquecimento recomendados no isolamento do microrganismo a partir de alimento, água, solo e amostras clínicas.

PALUMBO et al. (1985a), por exemplo, desenvolveram o ágar amido ampicilina (AAA), em que as colônias de *Aeromonas* spp se mostram bem distintas de outras espécies, pelo tamanho e pela reação de amilase. O amido é uma substância diferencial, uma vez que poucas espécies bacterianas em alimentos são capazes de hidrolizá-lo, e a ampicilina (10 mg/ml) suprime grande parte da microbiota contaminante. O AAA provou ser útil na detecção quantitativa de *Aeromonas* spp em alimentos frescos e vegetais (LEITÃO & SILVEIRA, 1991).

Relativamente aos caldos de enriquecimento, existem citações na literatura que comparam a eficiência da água peptonada alcalina, caldo tripticase-soja, caldo tripticase-soja + extrato de levedura, caldo de Rimles-Shotts modificado e, entre os ágar de isolamento, são citados, a saber: o ágar dextrina-ampicilina, o ágar vermelho de fenol-amido-ampicilina já mencionado, o ágar glicogênio-peptona-extrato de carne, o ágar Wagatsuma modificado, o ágar sangue ampicilina, o ágar de Rimles-Shotts, o ágar MacConkey, o ágar *Aeromonas* e o ágar seletivo para *Pseudomonas* e *Aeromonas* ou ágar GSP (ROSSI JR., 1998).

SEIDLER et al. (1980) relataram que um número significativo de cepas de *Aeromonas* spp isoladas em águas poluídas foi sensível a antibióticos, incluindo a ampicilina.

ROSSI JR. et al. (1996), ao trabalharem ao mesmo tempo com o ágar-dextrina-ampicilina e o ágar vermelho de fenol-amido-ampicilina para detectar a presença de *Aeromonas* spp, em amostras de carne bovina, observaram melhores resultados a partir do primeiro meio e destacaram a importância da utilização de mais de um meio de cultura na fase de isolamento seletivo, no sentido de melhorar a eficiência da técnica. Esta recomendação já havia sido afirmada por WALKER & BROOKS (1993).

As bactérias do gênero *Aeromonas* são consideradas oportunistas ao homem e aos animais (HAVELAAR et al., 1992). *A. hydrophila* é considerada patogênica para anfíbios (DE FIGUEIREDO & PLUMB, 1977), aos répteis (MARCUS, 1971) e aos peixes (HALEY et al., 1967).

A *A. salmonicida* não é considerada patogênica ao homem, mas é reconhecidamente patogênica para uma grande variedade de peixes (WALKER & BROOKS, 1993).

As espécies de *A. hydrophila* e *A. sobria* são tidas como as principais patogênicas ao homem (BUCHANAN & PALUMBO, 1985), e desempenha papel de importância também a espécie *A. caviae*, embora em menor escala (REINA et al., 1991). As demais espécies são envolvidas em casos esporádicos (REINA & LOPEZ, 1996).

As *Aeromonas* móveis podem ser responsáveis no homem por gastroenterites, celulites e bacteremias. DAVIS et al. (1978), JANDA (1991), BURKE et al. (1984) relataram a ocorrência de *Aeromonas* em casos de diarreia correlacionados com a presença da bactéria na água de beber.

Nesse sentido, o presente trabalho teve por objetivo comparar a eficiência de três diferentes sanitizantes, a saber: óxido de cálcio (CaO), formaldeído e biguanida polimérica, em viveiros de piscicultura, através da enumeração das bactérias do gênero *Aeromonas*, monitorando-se também o estado sanitário dos animais nos diferentes tratamentos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais e instalações

O presente experimento foi desenvolvido no Setor de Piscicultura do Departamento de Produção Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, no período de outubro de 1999 até o início de março de 2000, num total de 124 dias. Foram utilizados 804 alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), distribuídos em doze viveiros, cada um com 67 peixes. Os doze viveiros, medindo 9 x 5, ou seja, 45 m<sup>2</sup>, foram adequados ao tipo de criação intensiva em viveiros.

Os viveiros que foram utilizados no experimento passaram por uma padronização correspondente ao período de cinco meses que antecedeu ao início da pesquisa, ou seja, foram preparados sem receber qualquer sanitizante e povoados com a mesma espécie de peixe, a tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*). Os viveiros foram drena-

dos na mesma época, visando à manutenção das mesmas condições e uniformidade.

Ao chegar o momento da instalação do experimento, os doze viveiros permaneceram vazios por sete dias. Logo após a drenagem, ainda úmidos, depois de efetuado o sorteio, foram tratados com os respectivos sanitizantes em toda área do fundo e paredes, nas proporções indicadas para cada tratamento. O óxido de cálcio (CaO) foi espalhado manualmente, utilizando-se, para isso, luvas e máscara apropriadas. Procurou-se cobrir toda área do viveiro. O formaldeído e a biguanida polimérica foram diluídos em quantidades adequadas para 20 L e pulverizados com bomba costal, tomando-se o cuidado de cobrir adequadamente toda área do viveiro.

Cinco dias antes de os viveiros serem povoados, após a sanificação, adotou-se o manejo rotineiro, que consistiu em espalhar calcário agrícola no interior de cada viveiro na proporção de 100 g/m<sup>2</sup> e na adubação orgânica com esterco de aves na proporção de 200 g/m<sup>2</sup>. Decorrido o período de cinco dias após a realização da calagem e adubação, os viveiros foram povoados.

Foi colocado nas proximidades dos viveiros um pluviômetro, com o objetivo de medir a quantidade de chuva ocorrida durante o vazio sanitário.

#### Análises laboratoriais

Para a realização das análises laboratoriais, foram colhidas duas amostras de sedimento do fundo dos viveiros: a primeira no início do experimento (dia zero), antes da aplicação dos tratamentos, e a segunda oito dias após o início do experimento, com os viveiros ainda vazios.

As amostras de água foram colhidas mensalmente, resultando em um total de cinco colheitas e quinze amostras por tratamento testado.

#### Colheita das amostras

Para a colheita de amostras, tanto de sedimento quanto da água, os viveiros foram divididos visualmente em quatro quadrantes (1,2,3,4) e antes de cada procedimento foi realizado um sorteio para determinação do quadrante em que a colheita seria realizada.

O sedimento foi colhido em um frasco de plástico, devidamente esterilizado e obedecendo aos cuidados de assepsia. Após serem colhidas as amostras, elas foram transportadas ao laboratório do Centro de Pesquisa em Alimentos da Universidade Federal de Goiás, sob refrigeração, em caixa isotérmica e com gelo e, em seguida, processadas.

A água foi colhida em balões de 250ml, esterilizados, os quais eram rapidamente mergulhados com a boca para baixo a cerca de 15 a 30 cm abaixo da superfície da água, para evitar a introdução de contaminantes superficiais. Logo após, o balão era inclinado lentamente para cima, para permitir a saída do ar e conseqüentemente a entrada de água. Após a retirada do balão do corpo de água, era desprezada uma porção da amostra, de aproximadamente 50 ml, em que se deixou um espaço vazio para permitir uma boa homogeneização antes do início da análise.

#### Preparo das amostras e suas diluições

Para as análises do sedimento, 10 g da amostra foram homogeneizados, em 90 ml de água peptonada tamponada a 1% esterilizada. A partir da diluição inicial a 10<sup>-1</sup>, foi preparada uma série de diluições decimais até 10<sup>-4</sup>, utilizando-se da água peptonada a 0,1%.

Para análise da água dos viveiros, após homogeneização manual, procedeu-se ao preparo das diluições, iniciando-se com 1 ml da amostra que foi pipetado, assepticamente, e transferido para um tubo que continha 9ml de água peptonada a 0,1%, obtendo-se assim a diluição 10<sup>-1</sup>. Uma alíquota de 1ml da diluição 10<sup>-1</sup>, após homogeneização, foi tomada e transferida para tubo de ensaio com 9ml do mesmo diluente, obtendo-se, dessa forma, a diluição 10<sup>-2</sup>, e assim sucessivamente, até 10<sup>-4</sup> (MÉTODOS DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICAS PARA ALIMENTOS, 1999).

#### Contagem e identificação de *Aeromonas* spp

##### *Semeadura inicial das amostras*

Na superfície do ágar amido ampicilina -AAA (PALUMBO et al., 1985a, MAJEED et al., 1990), foi depositado um inóculo de 0,1 ml de cada diluição, que era, em seguida, espreado por toda a su-

perfície do meio com o auxílio de um bastão na forma da letra L, partindo-se sempre da maior diluição. A partir da terceira colheita, foi introduzido, para realização dessa etapa, também o ágar GSP, e, a partir da quarta colheita, o ágar TSA (ágar tripticase – soja), totalizando a utilização de três meios nessa etapa. A solução de ampicilina foi adicionada aos meios utilizados até a terceira colheita, e retirada nas demais, por ter sido observada certa inibição e, conseqüentemente, pouco crescimento. As placas após a semeadura e absorção do inóculo foram incubadas a 25°C, por 48 horas.

#### Contagem e identificação das colônias suspeitas

A contagem das unidades formadoras de colônias foi realizada em contador tipo Quebec e contadas todas as UFCs suspeitas que cresciam, uma vez que estavam crescendo poucas. Por causa da produção de amilase, as colônias suspeitas no AAA mostram-se de cor amarela com halo claro ao redor da colônia. No ágar GSP, eram consideradas suspeitas as colônias de coloração amarela, e no ágar TSA, as colônias de coloração bege-escura, brilhantes, com uma pequena elevação no centro. De cada placa de contagem, foram pescadas até cinco UFCs suspeitas, para serem submetidas à confirmação, através do perfil bioquímico compatível com as espécies de *Aeromonas*.

As colônias consideradas suspeitas foram semeadas em placas com ágar TSA e incubadas a 25°C por 48 horas. Após o período de incubação, foram realizados o teste do hidróxido de potássio e esfregaços corados pelo método de Gram (BARON et al., 1994). As culturas que se apresentavam na forma de bastonetes retos ou curvos, aos pares, isolados ou em cadeias curtas e Gram-negativas continuavam sendo consideradas suspeitas.

**Teste do hidróxido de potássio** (BARON et al., 1994). Com o auxílio de uma alça de níquel-cromo, pescou-se uma pequena porção de colônia pura e suspendeu-a em uma solução de hidróxido de potássio a 3% sobre uma lâmina de microscopia devidamente limpa e desengordurada. A cultura foi considerada Gram-negativa quando apresentou emulsificado viscoso/gelatinoso e Gram-positiva

quando o emulsificado não apresentou viscosidade/filamento.

Nessa fase também foram realizadas as provas de oxidase e catalase.

**Prova da oxidase** (MAC FADDIN, 1976). Para a realização dessa prova, foram realizados esfregaços da cultura, com o auxílio de um palito de madeira, em tira comercial de citrocomo-oxidase,<sup>1</sup> adquirida pronta para uso. Foram consideradas positivas as culturas cujos esfregaços tornavam-se de coloração arroxeadada em alguns segundos.

**Prova da catalase** (MAC FADDIN, 1976). Com o auxílio de uma alça de níquel-cromo, foram realizados esfregaços das culturas na superfície de lâminas de vidro limpas e desengorduradas. Em seguida, foi adicionada uma gota de água oxigenada a 10 volumes, e o imediato desprendimento de gás indicou teste positivo.

Após a realização dessas provas, as colônias consideradas sugestivas de *Aeromonas* foram repicadas em ágar tríplice-açúcar-ferro (TSI) (SAAD et al., 1995) e em ágar motilidade, e ambos incubados a 25°C por 48 horas.

**Prova de motilidade** (MAC FADDIN, 1976). Para a realização dessa prova, as culturas foram inoculadas, por picada profunda, em frascos de penicilina com ágar semi-sólido para teste de motilidade. Consideravam-se móveis as culturas que apresentavam crescimento em toda a extensão do frasco em que ocorreria turvação do meio.

**Comportamento no TSI** – Tríplice Sugar Iron (SAAD et al., 1995). Com o auxílio de uma agulha de níquel-cromo, as culturas foram inoculadas por picada até próximo do fundo dos tubos que continham o ágar TSI. Consideravam-se culturas suspeitas de *Aeromonas* quando se observou reação ácida tanto na base quanto no bisel ou reação ácida na base e alcalina no bisel, com ou sem formação de gás.

As culturas que apresentavam o comportamento no ágar TSI citado acima, e que eram oxidase e catalase positivas, foram consideradas como de *Aeromonas* spp, e foram novamente repicadas em tubos de ensaio contendo ágar tripticase-soja, incubadas a 25°C por 24 horas, e logo em seguida sub-

1. Bactident-Oxidase, Merck

metidas às provas bioquímicas para caracterização das espécies.

#### Caracterização da espécie de *Aeromonas*

A caracterização das espécies foi realizada seguindo o esquema proposto por POPOFF (1984), acrescido de algumas outras provas recomendadas por BUCHANAN & PALUMBO (1985) e ABEYTA JÚNIOR et al. (1990), compreendendo: produção do indol; hidrólise da esculina e da arginina; descarboxilação da lisina e ornitina; fermentação do inositol, da salicina, da sacarose, do manitol e da arabinose; produção de acetoina a partir de glicose (VP); crescimento em caldo nutriente a 25°C contendo 0%, 3% e 6% de cloreto de sódio e redução do nitrato a nitrito.

#### Exame dos peixes

O exame dos peixes foi realizado mensalmente no mesmo dia das biometrias, e foi colhido um peixe de cada tanque, num total de três amostras por tratamento. Os animais eram mantidos vivos na água, até o momento de serem encaminhados para o laboratório, onde eram realizados o exame clínico, os raspados de pele e brânquias, através do exame direto em microscopia de contraste de fase e a necrópsia.

#### Análises estatísticas

Para a avaliação dos sanitizantes, através das análises bacteriológicas, em amostras de sedimento do fundo dos viveiros, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, para cada período de amostragem, com quatro tratamentos e três repetições. Os tratamentos foram assim constituídos: T1 = testemunha, viveiro sem sanitização; T2 = sanitização com óxido de cálcio (CaO), na proporção de 100 g/m<sup>2</sup>; T3 = sanitização com formaldeído a 5%; T4 = sanitização com biguanida polimérica a 1%.

Para a contagem de bactérias do gênero *Aeromonas*, em amostras de água, foi utilizado o

delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 4 (meios de cultura x sanitizantes), no período 1 de amostragem, e 3 x 4 nos períodos 2, 3, 4 e 5.

Os resultados do experimento referentes a desempenho produtivo dos peixes foram submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias (Tukey a 5%), conforme procedimentos do programa computacional ESTAT [s.d.]. Os valores numéricos da contagem *Aeromonas* spp passaram por transformação radicial. As transformações propiciaram uma maior homogeneidade entre as variâncias (SAMPAIO, 1998). Após as transformações, os valores foram submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias (Tukey a 5%), conforme procedimentos do programa computacional ESTAT [s.d.].

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Análises laboratoriais do sedimento do fundo dos viveiros

Analisando-se a Tabela 1, observa-se que, com relação aos valores médios referentes à contagem de bactérias do gênero *Aeromonas*, nos dois períodos (antes e após a sanitização), verificou-se uma grande variação nos valores, que oscilaram entre 1,33x10<sup>2</sup> UFC/g e 3,30x10<sup>3</sup> UFC/g no período 1, e 6,03x10<sup>2</sup> UFC/g e 1,88x10<sup>3</sup> UFC/g no período 2. Esses valores estão abaixo dos encontrados por Seidler et al. (1980), que obtiveram em amostras de sedimento de um rio contagens de 4,5x10<sup>5</sup> UFC/g.

Verifica-se que em alguns tratamentos (Tabela 2) os valores médios encontrados no período 2 foram maiores que os obtidos no período 1. Isso pode ser explicado em parte pelo fato de a contagem de microrganismos ser considerada um tipo de variável muito instável, e ser influenciada por certos fatores, como a chuva, que comprovadamente ocorreu no intervalo entre o período 1 e o período 2.

**TABELA 2.** Análise de variância e valores médios obtidos para *Aeromonas* spp (UFC/g) em amostras de sedimento do fundo dos viveiros no período 1 (antes da sanitização) e no período 2 (depois da sanitização) em Goiânia, GO.

Tratamentos	Período 1 (antes da sanitização)	
	Variáveis	
	<i>Aeromonas</i>	
Testemunha	3,30x10 <sup>3</sup> a	
Óxido de cálcio	8,33x10 <sup>2</sup> a	
Formaldeído	8,66x10 <sup>2</sup> a	
Biguanida polimérica	1,33x10 <sup>2</sup> a	
Valores de F	1,26 <sup>NS</sup>	
C.V. (%)	97,08	
	Período 2 (depois da sanitização)	
Testemunha	9,76x10 <sup>2</sup> a	
Óxido de cálcio	1,88x10 <sup>3</sup> a	
Formaldeído	6,03x10 <sup>2</sup> a	
Biguanida polimérica	9,06x10 <sup>2</sup> a	
Valores de F	0,82 <sup>NS</sup>	
C.V. (%)	41,57	

<sup>NS</sup> – não significativo (P>0,05); C.V. = Coeficiente de variação; <sup>(1)</sup> – não houve variação entre dados individuais.

Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05)

### Análises bacteriológicas da água dos viveiros

A Tabela 2 contém os resultados da análise de variância e os valores médios das contagens de *Aeromonas* spp realizadas em ágar AAA, GSP e TSA nos cinco períodos. Observa-se que no período 1 não houve diferença significativa (P>0,05) entre os tratamentos testados. No entanto, no período 2, observou-se diferença significativa entre os meios de cultura utilizados, em que apresentaram melhor desempenho os ágares TSA, seguidos do AAA, e entre os sanitizantes com melhor eficácia da biguanida polimérica, que segundo Informe Técnico [s.d.] possui

uma rápida ação bactericida, independente das condições oferecidas, notadamente contra bactérias Gram-negativas, a *Aeromonas*. Nos períodos 3, 4 e 5 foi verificada diferença significativa em relação aos meios de cultura utilizados com melhor desempenho, no período 3 do ágar TSA, e nos períodos 4 e 5 dos ágares TSA e do AAA, mas não houve diferença em relação aos sanitizantes avaliados.

Analisando-se os valores médios para contagem de *Aeromonas* spp expressos na Tabela 3, verifica-se uma grande variação, que também foi detectada em trabalhos de outros autores como PATHAK et al. (1988), que em amostras de água de rios encontraram valores entre 1,1 x 10<sup>3</sup> e 1,6 x 10<sup>4</sup> UFC/100ml, e de SUCHART et al. (1991), que em água de viveiros com peixes encontraram contagens que variaram de 2,0 x 10<sup>2</sup> a 9,0x10<sup>3</sup> UFC/ml. As contagens obtidas neste estudo inferiores a 10<sup>3</sup> UFC/ml se assemelham às encontradas pelos autores antes citados, entretanto estão abaixo das médias encontradas por POFFÉ & BEEK (1991), que em águas que recebiam esgotos verificaram valores entre 10<sup>4</sup> e 10<sup>6</sup> UFC/ml.

Com relação aos valores das contagens de *Aeromonas* spp em ágar GSP (Tabela 3), nota-se que, no geral, os valores podem ser considerados menores que aqueles obtidos em que se empregaram os ágares AAA e TSA. Isso ocorreu, provavelmente, pela alta seletividade do ágar GSP e pelo baixo crescimento bacteriano de *Aeromonas* spp, embora NEVES et al. (1990) o tivessem utilizado e obtido bons resultados.

Com relação às análises bacteriológicas, é importante ressaltar que alguns fatores podem ter influenciado na eficácia dos sanitizantes, como por exemplo a chuva que ocorreu nos três dias seguintes à aplicação dos tratamentos, com índices pluviométricos de 12mm, 62mm e 19mm, respectivamente. Soma-se a isso a grande quantidade de matéria orgânica encontrada no fundo dos viveiros.

**TABELA 3.** Análise de variância e valores médios para contagem de *Aeromonas* (UFC/ml) realizada nos ágar AAA, GSP e TSA em amostras de água dos viveiros nos quatro tratamentos por cinco períodos em Goiânia, GO.

Causas de variação	Valores de F para <i>Aeromonas</i>				
	Período 1 <sup>(1)</sup>	Período 2 <sup>(2)</sup>	Período 3 <sup>(3)</sup>	Período 4 <sup>(4)</sup>	Período 5 <sup>(5)</sup>
Meios de cultura (M)	3,46 <sup>NS</sup>	8,60 **	9,45 **	6,53 **	9,73 **
Sanitizantes (S)	2,67 <sup>NS</sup>	3,53 *	0,01 <sup>NS</sup>	1,29 <sup>NS</sup>	1,14 <sup>NS</sup>
Interação MxS	0,40 <sup>NS</sup>	1,55 <sup>NS</sup>	0,61 <sup>NS</sup>	0,62 <sup>NS</sup>	0,62 <sup>NS</sup>
C.V.(%)	66,67	47,75	71,22	50,64	73,71
Médias					
Meios de cultura					
AAA	2,72x10 <sup>2</sup> a	1,26x10 <sup>2</sup> a	1,75x10 <sup>2</sup> b	5,17x10 <sup>2</sup> a	6,48x10 <sup>2</sup> a
GSP	1,50x10 <sup>2</sup> a	3,08x10 <sup>1</sup> b	6,05x10 <sup>1</sup> b	1,47x10 <sup>2</sup> b	2,25x10 <sup>1</sup> b
TSA	-	1,63x10 <sup>2</sup> a	7,64x10 <sup>2</sup> a	5,69x10 <sup>2</sup> a	8,62x10 <sup>2</sup> a
Sanitizantes					
Testemunha	2,16x10 <sup>2</sup> a	3,47x10 <sup>2</sup> a	3,00x10 <sup>2</sup> a	2,73x10 <sup>2</sup> a	2,75x10 <sup>2</sup> a
Óxido de cálcio	1,25x10 <sup>2</sup> a	1,34x10 <sup>2</sup> ab	2,24x10 <sup>2</sup> a	3,93x10 <sup>2</sup> a	2,20x10 <sup>2</sup> a
Formaldeído	3,86x10 <sup>2</sup> a	1,36x10 <sup>2</sup> ab	5,52x10 <sup>2</sup> a	2,58x10 <sup>2</sup> a	8,73x10 <sup>2</sup> a
Biguanida polimérica	1,16x10 <sup>2</sup> a	1,21x10 <sup>2</sup> b	2,55x10 <sup>2</sup> a	7,45x10 <sup>2</sup> a	6,75x10 <sup>2</sup> a

<sup>NS</sup> – Não significativo (P>0,05); \* P<0,05; \*\* P<0,01; C.V. = Coeficiente de variação; <sup>(1)</sup> – mesmo dia do povoamento com os peixes;

<sup>(2)</sup> 30 dias após o povoamento; <sup>(3)</sup> 60 dias após o povoamento; <sup>(4)</sup> 90 dias após o povoamento; <sup>(5)</sup> 120 dias após o povoamento.

Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

### Espécies isoladas de *Aeromonas*

Das 21 amostras analisadas – seis de sedimento e quinze de água – com o emprego do método do plaqueamento direto em ágar AAA, observou-se que 90,47% (19/21) das amostras colhidas em viveiros de três tratamentos (testemunha, com óxido de cálcio e formaldeído) foram positivas para *Aeromonas* spp. Uma porcentagem menor, 80,95% (17/21) das amostras do tratamento com biguanida polimérica, também foi positiva para *Aeromonas* spp, embora nesse tratamento uma das repetições tenha ficado prejudicada, por causa de acidente de laboratório. A detecção desses microrganismos na água e no sedimento do fundo dos viveiros já era esperada, uma vez que eles fazem parte da microbiota normal dos rios, podendo até se multiplicar em condições ambientais adequadas (SCHUBERT, 1975).

Do total de 15 amostras de água analisadas pelo método de plaqueamento direto em ágar seletivo GSP, 73,33% (11/15) das originárias dos tratamentos-testemunha e óxido de cálcio foram positivas para *Aeromonas* spp; 60% (9/15) do tratamento com formaldeído e 80% (12/15) do tratamento com biguanida polimérica também foram positivas para esse gênero bacteriano.

Das 12 amostras de água analisadas empregando-se o método de plaqueamento seletivo em ágar TSA com extrato de levedura, 100% (12/12) das originárias dos tratamentos-testemunha e óxido de cálcio e 91,66% (11/12) dos tratamentos com formaldeído e biguanida polimérica foram positivas para *Aeromonas* spp.

As Tabelas 4, 5 e 6 apresentam os valores expressos em porcentagem de amostras positivas para *Aeromonas* spp, bem como as espécies isoladas, em função dos ágar AAA, GSP e TSA, e dos tratamentos testados.

Na Tabela 4, observa-se que em todos tratamentos a espécie mais freqüente foi a *Aeromonas sobria*: testemunha 11 (57,90%), óxido de cálcio 13 (68,42%), formaldeído 11 (57,90%) e biguanida

polimérica 10 (58,82%), isto sem considerar os isolamentos simultâneos com outras espécies. A segunda espécie mais isolada e identificada foi a *Aeromonas hydrophila*, seguida pela *Aeromonas caviae*.

**TABELA 4.** Freqüência de amostras positivas para *Aeromonas* spp e espécies isoladas em ágar AAA, considerando-se os quatro tratamentos e 21 amostras por tratamento – seis de sedimento e quinze de água, no período de outubro de 1999 a março de 2000, em Goiânia, GO.

Porcentagem de positividade para <i>Aeromonas</i> spp	Tratamentos			
	Testemunha	Óxido de cálcio	Formaldeído	Biguanida polimérica
<i>A. caviae</i>	1(5,26)	-	3(15,80)	-
<i>A. hydrophila</i> n (%)	1(5,26)	1(5,26)	4(21,05)	-
<i>A. sobria</i> n (%)	11(57,90)	13(68,42)	11(57,90)	10(58,82)
<i>A. sobria, A. hydrophila</i> n (%)	1(5,26)	-	1(5,26)	1(5,88)
<i>A. sobria, A. caviae</i> n (%)	3(15,80)	-	-	3(17,65)
<i>A. hydrophila, A. caviae</i> n (%)	1(5,26)	3(15,8)	-	1(5,88)
<i>A. sobria, Aeromonas</i> spp n (%)	1(5,26)	-	-	1(5,88)
<i>A. sobria, A. schubertii, A. Hydrophila</i> n (%)	-	1(5,26)	-	-
<i>A. sobria, A. schubertii</i> n (%)	-	1(5,26)	-	-
<i>Aeromonas</i> spp, <i>A. schubertii, A. Hydrophila</i> n (%)	-	-	-	1(5,88)

n = número; % = porcentagem ;UFC/ml= unidade formadora de colônia por grama nas duas primeiras colheitas e por ml nas demais.

Comportamento semelhante em relação às freqüências de isolamento pode também ser observado nas Tabelas 5 e 6, mas torna-se importante ressaltar que o isolamento da *Aeromonas sobria* mos-

trou-se mais freqüente a partir da terceira colheita, momento em que a ampicilina foi retirada dos meios de cultura utilizados no plaqueamento seletivo.

**TABELA 5.** Freqüência de amostras de água positivas para *Aeromonas* spp e espécies isoladas em GSP, considerando-se os quatro tratamentos e 15 amostras por tratamento, no período de novembro de 1999 a março de 2000, em Goiânia, GO.

Porcentagem de positividade para <i>Aeromonas</i> spp	Tratamentos			
	Testemunha	Óxido de cálcio	Formaldeído	Biguanida polimérica
<i>A. caviae</i> n (%)	-	-	-	-
<i>A. hydrophila</i> n (%)	-	1(9,09)	1(11,11)	-
<i>A. sobria</i> n (%)	8(72,72)	7(63,64)	4(44,44)	8(66,66)
<i>A. sobria, A. hydrophila</i> n (%)	-	1(9,09)	1(11,11)	2(16,66)
<i>A. sobria, A. caviae</i> n (%)	1(9,09)	-	1(11,11)	-
<i>A. hydrophila, A. caviae</i> n (%)	1(9,09)	-	2(22,22)	1(8,34)
<i>A. hydrophila, Aeromonas</i> spp n (%)	-	-	-	1(8,34)
<i>A. sobria, A. schubertii, A. caviae</i> n (%)	1(9,09)	-	-	-
<i>A. sobria, Aeromonas</i> spp n (%)	-	1(9,09)	-	-
<i>Aeromonas</i> spp n (%)	-	1(9,09)	-	-

n = número; % = porcentagem: UFC/ml= unidade formadora de colônia por ml.

**TABELA 6.** Frequência de amostras de água positivas para *Aeromonas* spp e espécies isoladas em TSA, considerando-se os quatro tratamentos e 12 amostras por tratamento, no período de dezembro de 1999 a março de 2000, em Goiânia, GO.

Porcentagem de positividade para <i>Aeromonas</i> spp	Tratamentos			
	Testemunha	Óxido de cálcio	Formaldeído	Biguanida polimérica
<i>A. caviae</i> n (%)	-	-	-	-
<i>A. hydrophila</i> n (%)	1(8,33)	-	-	1(9,09)
<i>A. sobria</i> n (%)	9(75,00)	12(100)	8(72,73)	5(45,45)
<i>A. sobria, A. hydrophila</i> n (%)	1(8,33)	-	1(9,09)	-
<i>A. sobria, A. caviae</i> n (%)	-	-	1(9,09)	1(9,09)
<i>A. hydrophila, A. caviae</i> n (%)	-	-	-	-
<i>A. sobria, A. caviae, Aeromonas</i> spp n (%)	-	-	-	-
<i>A. sobria, A. schubertii</i> n (%)	1(8,33)	-	1(9,09)	3(27,27)
<i>Aeromonas</i> spp n (%)	-	-	-	1(9,09)

n = número; % = porcentagem: UFC/ml= unidade formadora de colônia por ml.

O emprego de mais de um meio de cultura na fase de plaqueamento seletivo seguiu recomendação de ROSSI JÚNIOR et al. (1996), no sentido de melhorar a eficiência da técnica. Entretanto, esta recomendação já havia sido feita por WALKER & BROOKS (1993), o que foi confirmado no presente estudo, pelo melhor desempenho dos ágar TSA, seguido do AAA.

O ágar TSA foi incluído no protocolo desta pesquisa, embora não seja considerado de eleição no plaqueamento seletivo para *Aeromonas* spp. No entanto, o caldo TSA tem sido muito utilizado na fase de enriquecimento para *Aeromonas* spp e mostrado comprovada eficiência (ABEYTA JR. et al. 1990).

A ampicilina é um componente do ágar importante por aumentar a seletividade do meio, visto que a maioria das espécies de *Aeromonas* spp é geralmente resistente ao antibiótico. No entanto, o seu uso neste estudo foi suprimido a partir da terceira colheita com a finalidade de promover melhor crescimento bacteriano, que se mostrou reduzido em amostras de água. A supressão do antibiótico proporcionou um incremento no número de unidades formadoras de colônias e no isolamento de *Aeromonas sobria*, o que, provavelmente, pode ser explicado pelo fato de a ampicilina e a penicilina inibirem o crescimento desta espécie.

PALUMBO et al. (1985a), utilizando o método de plaqueamento direto com ágar amido-ampicilina, confirmaram como sendo *Aeromonas* spp 80% das colônias suspeitas e isoladas, a partir do exame de diferentes amostras provenientes de ambiente aquático. LEITÃO & SILVEIRA (1991) encontraram uma positividade de 77% para *Aeromonas* spp, ao usarem o mesmo método de análise em diferentes tipos de amostra: água e pescado de origem marinha, e água e peixes de rios e hortaliças. No entanto, estes autores observaram maior frequência da espécie *Aeromonas hydrophila*, em discordância com os resultados obtidos neste estudo. Mas, de acordo com TURNBULL et al. (1984), ARAÚJO et al. (1991), a *Aeromonas caviae* é a espécie mais encontrada em água doce. Mas MATTÉ et al. (1995), ao analisarem 64 amostras de água de superfície e 24 de sedimento da Represa de Guarapiranga em São Paulo, verificaram que em 76,6% das amostras foi isolada *Aeromonas jandaei*, 43,7% *Aeromonas sobria*, 31,2% *Aeromonas caviae*, 18,7% *Aeromonas hydrophila*. Isso permite inferir que diferentes espécies de *Aeromonas* spp podem estar presentes nos ambientes aquáticos e que cada ambiente apresenta características distintas que podem influenciar nos resultados.

Observou-se também, neste estudo, o isolamento de *Aeromonas schubertii*, uma espécie

patogênica para o homem, que não havia sido isolada anteriormente de ambiente aquático. Estabeleceu-se, assim, um elo epidemiológico do microrganismo, que até então era encontrado apenas em materiais extra-intestinais, como sangue (bacteremia) e pele (feridas e celulite) (HICKMAN-BRENNER et al., 1988).

#### Exame dos peixes

Através do exame clínico realizado nos peixes, não foi detectada nenhuma alteração de relevância que evidenciasse a presença de enfermidade, a não ser na última análise, em que um dos exemplares provenientes do viveiro 10, repetição do tratamento-testemunha, apresentou um maior número de parasitas detectados, via exame direto em microscopia de contraste de fase. Embora não tenham sido observadas alterações de comportamento nesse viveiro até a realização da última biometria, os peixes examinados tinham bom aspecto externo e nenhuma anormalidade visível ao serem necropsiados.

#### CONCLUSÕES

Nas condições experimentais do presente estudo, os resultados obtidos permitem concluir que:

– os três sanitizantes avaliados diferiram estatisticamente entre si a 5% de probabilidade, em relação à contagem de bactérias do gênero *Aeromonas*, na água. Recomenda-se que pesquisas subsequentes sejam realizadas, com testes dos mesmos sanitizantes em dosagens diferentes.

– o monitoramento sanitário mostrou que a presença do agente patogênico nos peixes cultivados não significou necessariamente o aparecimento de doença, uma vez que esses microrganismos têm seu hábitat natural no sistema aquático.

#### REFERÊNCIAS

ABEYTA JR, C.; KAYSNER, C. A.; WEKELL, M. M.; STOFF, R. F. Incidence of motile aeromonas from United States west coast shellfish growing estuaries. **Journal of Food Protection**, v. 53, n. 10, p. 849-855, 1990.

ALLE, D. A.; AUSTIN, B.; COLWELL, R. R. *Aeromonas media*: a new species isolated from river water. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 6, p. 55-56, 1983.

ANDRADE, N. J.; MACEDO, J. A. B. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 1996. 182p.

ARAÚJO, R. M.; ARRIBAS, R. M.; PARES, R. Distribution of *Aeromonas* species in waters with different levels of pollution. **Journal Applied Microbiology**, v. 1, p. 182-186, 1991.

AUSTIN, D. A.; MCINTOSH, D.; AUSTIN, B. Taxonomy of fish associated *Aeromonas* spp, with the description of *Aeromonas salmonicida* subsp. *Smithia* subsp. Nov. **Applied Microbiology**, v. 11, p. 277-290, 1989.

BARON, E. J.; PETERSON, L. R.; FINEGOLD, S. M. **Diagnostic Microbiology**. 9º ed. St. Louis: Mosby, 1994. 958 p.

BERNARDINO, G.; FERRARI, V. A. Efeitos do uso de ração comercial no desempenho do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) em cativeiro. **Boletim Técnico do Cepta**, v. 2, p. 19-33, 1989.

BHOWMIK, M. L.; PANDEY, B. K.; SARKAR, U. K. Bacterial indicators of faecal pollution in sewage fed fish ponds. TECHNOLOGICAL ADVANCEMENTS IN FISHERIES PROCEEDINGS OF THE NATIONAL SYMPOSIUM ON TECH. **Proceedings...** 1998. p. 153-.

BUCHANAN, R. L.; PALUMBO, S. A. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* as potential food poisoning species: a review. **Journal of Food Safety**, v. 17, p. 15-29, 1985.

BUCHANAN, R. L.; PALUMBO, S. A. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* as potential food poisoning species: a review. **Journal of Food Safety**, v. 17, p. 15-29, 1985.

BURKE, V.; ROBINSON, J.; GRACEY, M.; PETERSON, D.; MEYER, N.; HALEY, V. Isolation of *Aeromonas* spp. from an unchlorinated domestic water supply. **Applied and environmental microbiology**, v. 48, p. 367-370, 1984.

- CAHILL, M. M. Bacterial flora of fishes: a review. **Microbiology Ecology**, v. 19, p. 21-41, 1990.
- CARNAHAN, A. M.; FANNING, G. R.; JOSEPH, S. W. *Aeromonas jandaei* (formely genospecies DNA group 9 *A. sobria*) a new sucrose- negative species isolated from clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 12, p. 101-106, 1991a.
- CARNAHAN, A. M.; CHAKRABORTY, T.; FANNING, G. R.; VERMA, D.; ALI, A.; JANDA, J. M.; JOSEPH, S. W. *Aeromonas trota* sp. Nov. an ampicilin-susceptible species isolated from clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 1206-1210, 1991b.
- DAVIS, W. A.; ANE, J. C.; GARAGUSI, V. F. Human *Aeromonas* infections: a review of the literature and a case report of endocarditis. **Medicine**, v. 57, p. 267-277, 1978.
- DE FIGUEIREDO, J.; PLUMB, J. A. Virulence of different isolates of *Aeromonas hydrophila* in channel catfish. **Aquaculture**, v. 11, p. 349-354, 1977.
- DELAMARE, S. O. P. C.; SILVEIRA, M. M.; ECHEVERRIGARAY, S. Growth of *Aeromonas* species on increasing concentrations of sodium chloride. **Letters in Applied Microbiology**, v. 30, p. 57-60, 2000.
- ESTAT. Sistema para análises estatísticas. (V.2.0). Pólo Computacional/ Departamento de Ciências Exatas/ Unesp – FCAV, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, SP [s.d.].
- ESTEVE, C.; GUTIÉRREZ, M. C.; VENTOSA, A. *Aeromonas encheleia* sp. Nov., isolated from European eels. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, n. 3, p. 462-466, 1995.
- HALEY, R.; DAVIS, S. P.; HYDE, J. M. Environmental stress and *Aeromonas liquefaciens* in American and threadfin shad mortalities. **Progressive FishCulturist**, v. 29, p. 193, 1967.
- HAVELAAR, A. H.; SCHETS, F. M.; VAN SILFHOUT, A.; JANSEN, W. H.; WIETEN, G.; VAN KOOIJ, D. Typing of *Aeromonas* strains from patients with diarrhoea and from drinking water. **Journal Applied Microbiology**, v. 72, p. 435-444, 1992.
- HICKMAN-BRENNER, F. W.; MACDONALD, K. L.; STEIGERWALT, A. G.; FANNING, G. R.; BRENNER, D. J.; FARMER III, J. J. *Aeromonas veronii*, a new ornithine decarboxylase-positive species that may cause diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, p. 900-906, 1987.
- HICKMAN-BRENNER, F. W.; FANNING, G. R.; ARDUINO, M. J.; BRENNER, DON. J.; FARMER, J. J. *Aeromonas schubertii*, a new mannitol-negative species found in human clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 26, n. 8, p. 1561-1564, 1988.
- KAPER, J. B.; SEIDLER, R. L.; LOCKMAN, H.; COLWELL, R. R. *Aeromonas hydrophila*: Ecology and toxigenicity of isolation from na estuary. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 50, p. 359-377, 1981.
- KERSTERS, I.; VAN VOOREN, L.; HUYS, G.; JANSSEN, P.; KERSTERS, K.; VERSTRAET, W. Influence of temperature and process technology on the occurrence of *Aeromonas* species and higienic indicator organisms in drinking water plants. **Microbiology Ecology**, v. 30, p. 203-218, 1995.
- KHARDORI, N.; FAINSTEIN, V. *Aeromonas* and *Plesiomonas* as etiological agents. **Anais in Veterinary Microbiology**, v. 42, p. 395-419, 1988.
- LEITÃO, M. F. F.; SILVEIRA, N. F. A. *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas shigelloides* na água, pescado e hortaliças, no estado de São Paulo. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 90-99, 1991.
- MAC FADDIN, J. F. **Biochemical tests for the identification of medial bacteria**. Baltimore: The Williams, Wilkins Co, 1976. 312p.
- MAJEED, K. N.; EGAN, A. F.; MAC RAE, I. C. Production of ecotoxins by *Aeromonas* spp at 5°C. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 69, p. 332-337, 1990.
- MARCUS, L. C. Infectious diseases of reptiles. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 159, p. 1629-1632, 1971.

- MARTÍNEZ-MURCIA, A. J.; ESTEVE, C.; GARAY, E.; COLLINS, M. D. *Aeromonas allosaccharophila* sp. Nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas*. **Microbiology Letters**, v. 91, p. 199-206, 1992.
- MATTÉ, M. H.; MATTÉ, G. R.; BALDASI, L.; NITRINI, S. M. O. Ocorrência de *Aeromonas* spp, em água de represa destinada à recreação e captação para abastecimento público. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 18., 1995. Santos, Sociedade Brasileira de Microbiologia, **Anais...** Santos, 1995, p. 49.
- MESQUITA, J. A.; NUNES, I. A.; OLIVEIRA, A. N.; LAGE, M. E.; SOUZA, E. M. B. *Aeromonas* spp. em produtos de origem animal e em água de consumo de Goiânia-GO. **Anais das Escolas de Agronomia e Veterinária**, v. 25, n. 2, p. 61-66, 1995.
- MÉTODOS DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA PARA ALIMENTOS. Ministério da Agricultura, Brasília, 1999. 250p. Apostila.
- MORAES, L. V. **Bactérias do gênero *Aeromonas* em peixe pintado (*Pseudoplatystoma* spp) e pesquisa de alguns fatores de virulência a partir de cepas isoladas.** 1994, 108p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.
- NEVES, M. S.; NUNES, M. P.; RICCIARDI, I. D. Incidence of motile *Aeromonas* species in aquatic environments of Rio de Janeiro, Brasil. **Journal Food Protection**, v. 53, n. 1, p. 1796-1798, 1990.
- PALUMBO, S. A.; MAXINO, F.; WILLIAMS, A. C.; BUCHANAN, R. L.; THAYER, D. W. Starch-ampicilin agar for the quantitative detection of *Aeromonas hydrophila*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, p. 1027-1030, 1985a.
- PALUMBO, S. A.; MORGAN, D. R.; BUCHANAN, R. L. Influence of temperature, NaCl pH on the growth of *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Food Science**, v. 50, p. 1417-1421, 1985b.
- PATHAK, S. P.; BHATTACHERJEE, J. W.; KALRA, N.; CHANDRA, S. Seasonal distribution of *Aeromonas hydrophila* in river water and isolation from river fish. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 65, p. 347-352, 1988.
- PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO M., R. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento.** Maringá: Nupélia, 1997 264p.
- POFFÉ, R.; BEECK, E. O. P. Enumeration of *Aeromonas hydrophila* from domestic wastewater treatment plants and surface waters. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 71, p. 366-370, 1991.
- POPOFF, M. Genus III. *Aeromonas* Kluyver and Van Niel. In: DRIEG, Noel R. (Ed), **Bergey's manual of systematic bacteriology.** Baltimore: Williams and Wilkins, p. 545-548, 1984.
- REINA, J.; ILOMPART, I.; GÓMEZ, J.; BORRELL, N.; SERRA, A. *Aeromonas caviae*: principal especie enteropatógena del grupo de las *Aeromonas* mesófilas durante el período de lactancia artificial en la población de Palma de Mallorca (Baleares). **Revista Espanhola de Pediatria**, v. 47, n. 2, p. 146-150, 1991.
- REINA, J.; LOPEZ, A. Gastroenteritis caused by *Aeromonas trota* in a child. **Journal of Clinical Pathology**, v. 49, p. 173-175, 1996.
- ROSSI JÚNIOR, O. D.; SANTOS, I. F.; AMARAL, L. A.; BARBOSA, A. M. Bacteria of the genus *Aeromonas* in water and beef obtained at the industrial level. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 3, n. 3, p. 75-78, 1996.
- ROSSI JR. O. D. **Fontes de contaminação da carne bovina por bactérias do gênero *Aeromonas* e formas de disseminação destes microrganismos nas diferentes fases do fluxo-grama de abate:** comportamento frente a antimicrobianos e capacidade enteroxigênio das cepas isoladas. 1998, 154p. Livre Docência. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, Unesp, Jaboticabal, 1998.
- SAAD, S. M. I.; IARIA, S. T.; FURNALETTO, S. M. P. Motile *Aeromonas* ssp. In retail vegetables from São Paulo, Brazil. **Revista de Microbiologia**, v. 26, p. 22-27, 1995.
- SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal.** Belo Horizonte: Fundação de

Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.

SCHUBERT, R. H. W.; HEGAZI, M.; WAHLING, W. *Aeromonas enteropelogenes* species new. **Hygiene Medicine**, v. 15, p. 471-472, 1990a.

SCHUBERT, R. H. W.; HEGAZI, M.; WAHLING, W. *Aeromonas ichthiosmia* species new. **Hygiene Medicine**, v. 15, p. 477-479, 1990b.

SEIDLER, R. J.; ALLEN, D. A.; LOCKMAN, H.; COLWELL, R. R.; JOSEPH, S. W.; DAILY, O. P. Isolation, enumeration and characterization of *Aeromonas* from polluted waters encountered in diving operations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 1010-1018, 1980.

SUCHART, I.; SOPA, A.; PRIPAN, T. **Variation of water quality, phytoplankton and bacteria in catfish pond**: Proceeding of the Seminar on Fisheries. Bangkok, Thailand, p. 243-254, 1991. Resumo.

TURNBULL, P. C. B.; LEE, J. V.; MILIOTIS, M. D.; VAN DE WALLE, S.; KOORNHOF, H. J.; JEFFERY, L. J.; BRYANT, T. N. Enterotoxin production in relation to taxonomic grouping and source of isolation of *Aeromonas* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 19, p. 175-180, 1984.

VON GRAEVENITZ, A.; MENSCH, A. H. The genus *Aeromonas* in human bacteriology: report of 30 cases and review of literature. **New England Journal of Medicine** v. 278, p. 245-249, 1968.

VON GRAEVENITZ, A. Research on *Aeromonas* and *Plesiomonas*. **Experientia**, v. 43, p. 348-361, 1987.

WALKER, S. J.; BROOKS, J. Survey of the incidence of *Aeromonas* and *Yersinia* species in retail foods. **Food Control**, v. 4, n. 1, p. 34-40, 1993.