

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA  
FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E  
MOLECULAR POR PCR-RFLP E ANÁLISE DOS  
POLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS NA FORMAÇÃO DE  
BIOFILME DE *Flavobacterium columnare* EM PEIXES**

**Fernanda de Alexandre Sebastião**

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA  
FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E  
MOLECULAR POR PCR-RFLP E ANÁLISE DOS  
POLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS NA FORMAÇÃO DE  
BIOFILME DE *Flavobacterium columnare* EM PEIXES**

**Fernanda de Alexandre Sebastião**

**Orientador: Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos**

**Co-orientadora: Dra. Fabiana Pilarski**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,  
Câmpus de Jaboticabal, como parte das  
exigências para a obtenção do título de Mestre  
em Microbiologia Agropecuária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Março de 2010

S443i Sebastião, Fernanda de Alexandre  
Isolamento, caracterização bioquímica e molecular por PCR-RFLP e análise dos polissacarídeos produzidos na formação de biofilme de *Flavobacterium columnare* em peixes/ Fernanda de Alexandre Sebastião – – Jaboticabal, 2010  
viii, 82 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010  
Orientador: Manoel Victor Franco Lemos  
Banca examinadora: Manoel Victor Franco Lemos, Maria Inês Tiraboshi Ferro, Maria José Tavares Ranzani de Paiva.  
Bibliografia

1. *Flavobacterium columnare*. 2. PCR-RFLP. 3. Exopolissacarídeos. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 639

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**FERNANDA DE**

**ALEXANDRE SEBASTIÃO** – nascida em 08 de agosto de 1983, na cidade de Jaboticabal – SP, é bióloga licenciada e bacharel, formada pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), campus Jaboticabal, em dezembro de 2007. Foi bolsista CNPQ – Reitoria no período de 2004 a 2005 e Fapesp, no ano de 2007. Ingressou no curso de Pós – Graduação (mestrado) pelo programa de Microbiologia Agropecuária na mesma instituição, sendo bolsista CAPES.

***A vida não dá nem empresta; não se comove nem se apieda. Tudo quanto ela faz é retribuir e transferir aquilo que nós lhe oferecemos (Vicente Avelino).***

## AGRADECIMENTOS

Agradecer a todos que ajudaram a concretizar este trabalho não é tarefa fácil. O maior perigo que se coloca para o agradecimento seletivo não é decidir quem incluir, mas escolher quem não mencionar, por isso, é melhor começar do início.

Agradeço:

- A Deus, pela vida, saúde e a oportunidade de fazer parte de uma família maravilhosa;
- A meus pais, Geraldo Aparecido Sebastião e Maria Aparecida de Alexandre Sebastião, pelo discernimento e inteligência ao acreditarem que a educação é o melhor caminho para a formação dos filhos. Agradeço também a dedicação e o esforço de vocês durante todos esses anos para que eu me formasse um ser humano digno;
- À minha avó Mileide Fernandes Sebastião pelo apoio emocional nas horas difíceis;
- À minha irmã Roberta de Alexandre Sebastião pelos conselhos importantes;
- Ao meu orientador Prof. Manoel Victor Franco Lemos por ter aceito a orientação do trabalho, contribuindo de forma material, emocional e intelectual para a realização deste, conferindo muito prestígio à dissertação;
- À minha co-orientadora Fabiana Pilarski pelo incentivo, anos de boa convivência, apoio, confiança e aquisição de conhecimentos e experiências na área científica e na vida;
- À banca examinadora nas pessoas da Profa. Dra. Maria José Tavares Ranzani Paiva e Profa. Dra. Maria Inês Tiraboshi Ferro, muito obrigada por suas contribuições.
- A todos os amigos do Laboratório de Genética de Bactérias de Biotecnologia Aplicada que me ajudaram com dicas essenciais: Janaína, Martinha, Suzana M., Rebeca, Lúcia, Meire, nossa técnica Eliane Cristina da Cunha Alves (Li) e minha amiga do coração Vivian Boter Bergamasco, cuja amizade é inestimável;

- Aos amigos do Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos por receberem e cuidarem dos peixes doentes: Fabiana Pilarski, José Dias Neto e Róberson Sakabe;
- Ao pessoal do Departamento de Patologia Veterinária pelo espaço cedido para o cultivo das bactérias;
- À técnica Silvina e ao Prof. Dr. Pablo do Departamento de Microbiologia, que forneceram todo o material e orientações necessárias para a realização dos testes bioquímicos deste trabalho;
- Profa. Dra. Eliana e à Tereza pela oportunidade de trabalhar com o HPLC, viabilizando mais uma etapa deste estudo;
- À CAPES pelo apoio financeiro;
- À FCAV/Jaboticabal, ao CAUNESP/Jaboticabal e ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária pela oportunidade de aprimorar conhecimentos;
- Aos queridos peixes (tilápias, tambaquis e matrinxãs) que com suas vidas contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e da Ciência.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	1
AQUICULTURA.....	2
TAXONOMIA.....	3
DESCRIÇÃO FENOTÍPICA DAS BACTÉRIAS .....	5
SINAIS CLÍNICOS DA COLUMNARIOSE.....	8
DESCRIÇÃO FENOTÍPICA DOS HOSPEDEIROS.....	9
MÉTODO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR .....	10
OBJETIVOS .....	15
REFERÊNCIA .....	16
<b>CAPÍTULO 2 - Isolamento e caracterização bioquímica e molecular de cepas de <i>Flavobacterium columnare</i> do Brasil</b> .....	23
INTRODUÇÃO .....	24
MATERIAL E MÉTODOS.....	25
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS.....	48
<b>CAPÍTULO 3 – Relação da presença de cápsula com a formação de biofilme em <i>Flavobacterium columnare</i> do Brasil</b> .....	52
INTRODUÇÃO .....	53
MATERIAL E MÉTODOS.....	54
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS.....	61
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
<b>APÊNDICE</b> .....	65



## **ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR POR PCR-RFLP E ANÁLISE DOS POLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS NA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Flavobacterium columnare* EM PEIXES**

**RESUMO** - Dentre as enfermidades de importância na piscicultura, destaca-se a columnariose, cujo agente etiológico é a *Flavobacterium columnare*, bactéria de ampla distribuição geográfica, responsável por um elevado número de mortalidade em peixes de várias espécies, principalmente em condições intensivas de criação. Visando o melhor conhecimento desta bactéria para desenvolvimento de métodos de diagnóstico e controle da doença, os objetivos deste estudo foram isolar, caracterizar bioquímica e molecularmente por PCR-RFLP do gene 16S rDNA de *F. columnare*, detectar fenotipicamente a formação de cápsulas destes isolados pelo teste Agar vermelho congo, e avaliar a composição do EPS quando produzidos por meio de cromatografia líquida de alta eficiência. Ao todo foram obtidos 37 isolados e a caracterização bioquímica indica que os isolamentos são classificados como *F. columnare*. O filograma gerado pela técnica de PCR-RFLP mostrou três principais ramificações entre os isolados de *F. columnare*. Os testes comprovaram que a presença de cápsula na célula bacteriana não está diretamente relacionada à formação de biofilme, e o monossacarídeo preponderante em *F. columnare* é a glicose. Portanto, a utilização da PCR-RFLP para a identificação da bactéria apresentou-se como ferramenta mais rápida que as técnicas bioquímicas atuais e os dados referentes a produção de biofilme são relevantes para futuros estudos que busquem métodos enzimáticos para impedimento da aderência e formação de biofilmes destes patógenos aquáticos em sistemas de aquicultura e consequentemente a prevenção da columnariose.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Flavobacterium columnare*, PCR-RFLP, exopolissacarídeos.

**ISOLATION, BIOCHEMICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION BY  
PCR-RFLP AND POLYSACCHARIDE ANALYSIS PRODUCED IN BIOFILME  
FORMATION OF *Flavobacterium columnare* IN FISH**

**SUMMARY** – Columnaris disease stands out among the illnesses of importance in fish breeding, its etiological agent is *Flavobacterium columnare*, which has been recognized as a worldwide pathogen, responsible for high degree of mortality in many fish species, especially in conditions of intensive breed. Looking for a better knowledge of this bacteria and aiming to develop diagnosis methods and disease control, the objectives of this study were to isolate, to biochemistry and molecularly characterize by 16S rDNA gene PCR-RFLP of *F. columnare*, to detect phenotipically the formation of capsules by the agar Congo red method, and to evaluate the EPS composition by high-performance liquid chromatography. There were obtained 37 isolates and the biochemistry characterization indicated that the isolates were classified as *F. columnare*. The phylogenetic tree generated by PCR-RFLP technique showed three main branches among the *F. columnare* isolates. The presence of capsule on the bacterial cells has not a direct relationship to biofilm formation, and considering its composition it was observed that the preponderant monosaccharide is glucose. Therefore, the PCR-RFLP alternative to identify this bacteria presented itself as a faster tool than actual biochemical techniques and the results regarding to biofilm production are relevant to future studies that search for enzymatic methods to abolish the adherence and biofilm formation by this aquatic pathogen in aquaculture systems, and, consequently, columnaris disease prevention.

**KEYWORDS:** *Flavobacterium columnare*, PCR-RFLP, exopolysaccharide.

## CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

As bactérias são organismos que possuem uma grande importância na piscicultura pelas doenças que provocam, as quais geram um impacto econômico apreciável nas populações de peixes. As taxas de mortalidade são por vezes muito elevadas, especialmente em situações de estresse dos hospedeiros (BADER *et al.*, 2003; JINU & GOODWIN, 2004; SCHNECK & CASLAKE., 2006; KUNTTU *et al.*, 2009). Dentre as enfermidades de etiologia bacteriana em sistemas de criação intensiva de tilápia, destacam-se a septicemia por *Streptococcus* spp., e as bacterioses causadas por *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Vibrio* sp., *Flavobacterium columnare* e *Edwardsiella* sp. (ROBERTS & SOMMERVILLE, 1982; FIGUEIREDO & LEAL, 2008).

A *Flavobacterium columnare* é o agente etiológico da columnariose, uma bactéria oportunista, que compõe parte da microbiota normal da água, pele e brânquias dos peixes. É comumente observada nas pisciculturas de água doce e está descrita para numerosos hospedeiros como a truta, salmão, carpa, tilápia, perca, peixes siluriformes, etc, tendo vasta distribuição geográfica. Todos os peixes de água doce são considerados sujeitos à infecção (BERNARDET e GRIMONT, 1989).

Sendo assim, a columnariose pode se manifestar sob condições normais de criação, no entanto, quando os peixes estão estressados, a probabilidade de aparecimento da enfermidade é maior. As altas temperaturas, bem como a elevada concentração de amônia e matéria orgânica na água, ou os baixos níveis de oxigênio são fatores que favorecem as epizootias (DURBOROW *et al.*, 1998; FIGUEIREDO & LEAL, 2008).

Segundo ARIAS, *et al.* (2004), nos Estados Unidos, a columnariose é a segunda maior causa de perdas na produção de bagre americano, e isso se reflete na indústria pesqueira com prejuízos estimados em milhões de dólares (USDA, 2003).

A columnariose além de ser um grave problema de sanidade, diminui a produção, devido à elevada e rápida mortalidade dos alevinos, chegando até mesmo a

dizimar cardumes. Apesar deste fato, poucos são os trabalhos existentes na literatura brasileira que abordam a columnariose (PILARSKI et al., 2008).

A caracterização molecular tem sido utilizada em estudos epidemiológicos para identificar diferentes genótipos de patógenos de uma forma segura e altamente eficiente, além ser mais rápida que os outros métodos. Os reconhecimentos da prevalência de uns genótipos particulares numa infecção e os seus padrões podem ajudar a comunidade científica a desenvolver métodos mais eficazes no controle de ictiopatologias (DARWISH & ISMAIEL, 2005; OLIVARES-FUSTER et al., 2007; FIGUEIREDO & LEAL, 2008).

Apesar da importância da infecção por *F. columnare* em peixes de produção no Brasil, poucos estudos foram realizados no campo da biologia molecular e a maneira pelo quais as bactérias do gênero *Flavobacterium* formam o biofilme ainda não foi elucidada. Para tanto, o presente trabalho objetiva a caracterização molecular desta bactéria, utilizando a técnica de PCR-RFLP, além do estudo dos polissacarídeos produzidos por *F. columnare*, uma vez que a sua adesão no peixe ou numa superfície inanimada pode estar relacionada à quantidade de polissacarídeos constituintes presentes na cápsula.

## **REVISÃO DE LITERATURA**

### **AQUICULTURA**

Segundo dados da Food and Agriculture Organization (2006), o crescimento da aquicultura no Brasil superou a média mundial, tornando-se o setor da agropecuária nacional que mais se expandiu nos últimos anos.

A aquicultura aparece como um mercado estratégico para o desenvolvimento sustentável, produção de alimentos e ampliação de fronteiras inexploradas no país. Todavia, apesar de sua evidente importância, as suas atividades ainda não foram incluídas no censo agropecuário brasileiro.

Para tanto, foi realizado um levantamento em âmbito nacional para se coletar dados sobre as características, perspectivas e limitações da atividade aquícola (VALENTI et al., 2000). Dentre os entraves apontados, destacam-se os aspectos sanitários da produção e a falta de estrutura para o diagnóstico das principais enfermidades infecciosas.

As principais bactérias patogênicas no campo da piscicultura são as *Aeromonas* móveis, *Flavobacterium columnare* e *Streptococcus agalactiae*. Atualmente, o controle dessas doenças no país é feito pelo uso de antibióticos incorporados à ração ou na água de cultivo, o que gera grande impacto no ambiente aquático devido aos resíduos químicos liberados na água e a seleção de microrganismos resistentes; além disso, os resíduos de antibióticos em carcaças de peixes atuam como uma barreira à exportação desse produto aos Estados Unidos e Europa (FIGUEIREDO & LEAL, 2008).

Tendo em vista o quadro exposto por VALENTI et al (2000) a respeito das principais bactérias causadoras de patologias na piscicultura, o presente trabalho estudou as três espécies apontadas, todavia o microrganismo principal das análises e isolamentos foi *Flavobacterium columnare* e as duas outras espécies foram apenas utilizadas como controle negativo na caracterização molecular.

Para que haja um conhecimento prévio de cada uma das espécies citadas, segue-se uma breve caracterização com base em dados da literatura.

## **TAXONOMIA**

### ***Aeromonas hydrophila***

ANGKA et al. (1995) isolaram *A. hydrophila* de bagre do canal, *Ictalurus punctatus*, de diversos ambientes do oeste de Java, na Indonésia e verificaram que as cepas da bactéria apresentaram diferentes níveis de virulência. Várias cepas foram capazes de provocar lise de eritrócitos de peixes, coelhos, ovelhas, vacas, cavalos e do homem. Até cinco dias após a injeção intraperitoneal da bactéria, os peixes

apresentaram lesões musculares, na pele do local da injeção, no fígado e rins. A presença deste patógeno é maior em águas com temperaturas mais elevadas, particularmente na aquicultura de países tropicais (VIEIRA, 2003).

### ***Flavobacterium columnare***

A columnariose foi primeiramente descrita por Herbert Spencer Davis em 1922, no rio Mississippi, sendo uma das mais antigas doenças de peixes de água doce a se estudada na América do Norte. Nesta época o agente causal recebeu o nome de *Bacillus columnaris*. Todavia só foi cultivado e caracterizado com sucesso em 1944, quando ORDAL e RUCKER desenvolveram métodos de isolamento e meios de cultura bacterianos.

ORDAL & RUCKER (1944), renomearam a bactéria para *Chondrococcus columnaris*. A partir de então a bactéria tem sido renomeada e reclassificada inúmeras vezes com base nas características morfológicas e bioquímicas, sendo referidas como *Flexibacter columnaris*, *Cytophaga columnaris*, e mais recentemente, *Flavobacterium columnare* (BERNARDET et al., 1996; OLIVARES-FUSTER et al., 2007) devido a caracterização molecular das cepas estocadas por BERNARDET et al., (1996). O fator comum entre esses gêneros consiste na dificuldade de identificação das espécies (AUSTIN & AUSTIN, 1989).

### ***Streptococcus agalactiae***

O gênero *Streptococcus* sofreu muitas alterações taxonômicas desde sua primeira descrição. A maioria dessas modificações foi baseada em técnicas moleculares após a publicação do segundo volume do “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” em 1986 (LIU e NIZET, 2004).

As primeiras classificações foram baseadas unicamente na atividade hemolítica e nas reações sorológicas com anticorpos de Lancefield. Já em 1995, KAWAMURA et al.

determinaram seqüências de rRNA 16S de amostras de *Streptococcus* sp. com interessantes relações filogenéticas entre as espécies, sugerindo mudanças na classificação do gênero. Essa análise comparativa subdividiu o gênero nos grupos “bovis”, “salivarius”, “mutans”, “mitis”, “anginosus” e o “piogênico”, que inclui, entre outras, as espécies *S. pyogenes* e *S. agalactiae* (SALVADOR, 2008).

## **DESCRIÇÃO FENOTÍPICA DAS BACTÉRIAS**

### ***A. hydrophila***

A bactéria *A. hydrophila* é um bastonete gram-negativo, móvel, possui flagelos polares, não produz esporos, não capsulada, podendo ser aeróbia ou anaeróbia facultativa (STOSKOPF, 1993). Tem ampla distribuição geográfica e causa a septicemia hemorrágica, caracterizada pela presença de pequenas lesões superficiais, hemorragias locais (brânquias e opérculos), úlceras, exoftalmia e distensão abdominal. Internamente, pode verificar-se acúmulo de líquido ascítico, anemia e lesões no fígado e rins (AUSTIN E AUSTIN, 1987).

A doença causada por *A. hydrophila* está associada ao excesso de matéria orgânica na água (POST, 1987), acometendo peixes em condições de estresse e/ou associa-se à infecção por outros patógenos, como no caso do protozoário ciliado *Epistylis*. Alguns isolados podem ser considerados patógenos entéricos de humanos. Assim, a presença de elevados níveis de *Aeromonas* em piscicultura intensiva pode apresentar risco de infecção para o peixe e também para funcionários da piscicultura e consumidores (GARCIA, 2005).

### ***F. columnare***

A associação de informações fenotípicas, bioquímicas e moleculares é essencial para a descrição de novas espécies pertencentes ao gênero *Flavobacterium*.

A bactéria *F.columnare* é um bastonete Gram negativo longo, não flagelado, com lados paralelos suavemente irregulares e circulares ou afilado, com 0,3 a 0,7  $\mu\text{m}$  de extensão e exibe motilidade por deslizamento em superfícies sólidas (SCHNECK & CASLAKE, 2006; OLIVARES-FUSTER et al., 2007). As células em culturas velhas podem formar corpos esféricos, incluindo a formação de massas de células como colunas. A temperatura de cultivo varia entre 4°C e 35°C, sendo 25°C o ótimo (AMEND, 1982).

Esta espécie apresenta crescimento estritamente aeróbio, não produz ácidos a partir de carboidratos, é positiva para citocromo oxidase e catalase, reduz nitrato em nitrito, produz sulfato de hidrogênio, não hidrolisa celulose, ágar e amido, porém hidrolisa gelatina, caseína e tirosina, não descarboxila arginina, lisina e ornitina e produz pigmentos de flexirrubina (GRIFFIN, 1992; FIGUEIREDO & LEAL, 2008).

A morfologia da colônia pode ser rizóide, mucóide ou em forma de favo de mel (TRIYANTO & WAKABAYASHI, 1999; KUNTTU et al., 2009). Em meio sólido o crescimento das colônias se inicia com uma coloração amarelo pálido e ao final do terceiro dia são tipicamente amareladas, já em meio líquido, o crescimento é turvo e algumas vezes possuem uma película que se torna amarelada com a idade da cultura (GARNJOBST, 1945; SCHRECKENBERGER, 1998;).

Existem cinco características que as diferenciam das demais bactérias aquáticas Gram negativas: (1) habilidade de crescimento na presença de sulfato de neomicina e polimixina B, (2) produção de colônias tipo rizóide de pigmentação amarela, (3) produção de enzima que degrada gelatina, (4) absorção do vermelho congo pelas colônias (5) produção da enzima de degradação de sulfato de condroitina A (GRIFFIN, 1992).

A composição de seu DNA varia de 29 a 45% de guanina+citosina (JOOSTE & HUGO, 1999). Muitos estudos têm revelado variação entre os isolados de *F. columnare* cultivados em diferentes hospedeiros e regiões geográficas. SHAMSUDIN & PLUMB (1996) isolaram essa bactéria de quatro espécies diferentes de peixes e estas mostraram características bioquímicas uniformes, mas diferiram na habilidade de crescer a 15°C em meio com 0,5% NaCl ou em pH de 6 ou 10.



Sua multiplicação é por divisão transversa, freqüentemente dentro de duas células de aproximadamente igual tamanho. Não formam esporos e produzem polímeros extracelulares que deixam um vestígio de muco, permitindo seu deslizamento (CARLSON & PACHA, 1968).

Apesar de sua patogenicidade, os mecanismos de virulência da *F. columnare* são desconhecidos. O que se sabe é que diferentes grupos genéticos expressam graus de virulência distintos e também que a atividade da enzima condroitina AC liase em degradar os tecidos conectivos do peixe e a capacidade de adesão às brânquias também estão relacionadas à virulência de *F. columnare*.

Por outro lado, diferenças nos perfis de lipopolissacarídeos e proteínas entre as cepas virulentas e não virulentas têm sido detectadas, uma vez que em algumas bactérias patogênicas os componentes da superfície, como LPS e material capsular funcionam como fatores de virulência (KUNTTU et al., 2009).

### ***S. agalactiae***

As espécies de estreptococos do grupo B de Lancefield, assim como outras do gênero, são células esféricas ou ovóides gram-positivas, catalase-negativas, que se apresentam aos pares ou em cadeias. São imóveis, não esporuladas e anaeróbias facultativas. Obtêm energia por meio da fermentação de carboidratos como a glicose, que resulta em sua maior parte, em ácido láctico (HARDIE e WHILEY, 1997; KILLIAN, 1998).

A especificidade dos estreptococos é conferida pelo polissacarídeo capsular e pelos antígenos protéicos. A cápsula promove aderência às superfícies epiteliais para posterior invasão. Porém seu papel mais importante como fator de virulência é a capacidade de seus polissacarídeos inibirem a fagocitose por macrófagos e neutrófilos do hospedeiro (NIZET, 2002).

*S. agalactiae* é o agente etiológico da septicemia e meningoencefalite em peixes, e atualmente é o principal agente causador de perdas na produção de tilápia do

Nilo no mundo; em vacas é responsável pela mastite bovina e em humanos neonatais causa septicemia, pneumonia, meningite, osteomielites e infecções nos tecidos moles (OLIVARES-FUSTER et al., 2008).

## **SINAIS CLÍNICOS DA COLUMNARIOSE**

Peixes com columnariose apresentam pontos acinzentados ou áreas amareladas de erosão, geralmente envoltas por uma zona avermelhada hiperêmica na cabeça, superfície corporal e brânquias, locais de progressivas necroses, envolvendo a epiderme, derme e musculatura (FIGUEIREDO & LEAL, 2008).

As lesões são cobertas por um exudato amarelado onde é encontrado um grande número de *F. columnare*, por isso é comum a morte do peixe em 48 horas após o surgimento da descoloração na pele (WAKABAYASHI, 1991). Quando essas lesões ocorrem ao redor da nadadeira dorsal, denomina-se “doença da sela” (DURBOROW, 1998; DECOSTERE et al., 1999b).

## **DESCRIÇÃO FENOTÍPICA DOS HOSPEDEIROS**

Dentre os vários peixes nativos brasileiros, ou não, que despertaram o interesse dos piscicultores devido ao crescimento rápido, boa conversão alimentar, facilidade de reprodução induzida e até por características apropriadas à pesca esportiva, selecionou-se para este trabalho as seguintes espécies:

Matrinã (*Brycon cephalus*), uma espécie da subfamília Bryconinae proveniente da Bacia Amazônica e Araguaia-Tocantins (TAVARES-DIAS et al., 1999), onde vivem em rios de águas claras, principalmente junto às pedras e troncos submersos, alimentando-se de frutos, sementes, insetos e pequenos peixes. Caracterizam-se por corpo de coloração prateada, alongado e pouco comprimido lateralmente, nadadeira caudal escura e as restantes alaranjadas. Apresentam mancha escura junto ao

opérculo, boca com dentes pontiagudos dispostos em várias fileiras no maxilar superior. Podem alcançar 60 cm de comprimento e pesarem 5 Kg.

Tambaqui (*Colossoma macropomum*), peixe teleósteo de água doce pertencente à ordem Characiformes, família Serrasalminidae (GÉRY, 1977), nativo das bacias do Amazonas, Orenoco e afluentes (CHAGAS & VAL, 2003). Peixe de escamas; corpo romboidal, nadadeira adiposa curta com raios na extremidade, dentes molariformes e rastros branquiais longos e numerosos. A coloração geralmente é parda na metade superior e preta na metade inferior do corpo, mas pode variar dependendo da cor da água. O tambaqui alcança cerca de 90 cm de comprimento total. É uma espécie que realiza migrações reprodutivas.

Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), pertencente à família dos peixes ciclídeos, de água doce pertencentes à sub-família Pseudocrenilabrinae. São nativas da África, mas foram introduzidas em muitos lugares da América do Sul e sul da América do Norte, tornando-se, na última década, a espécie mais cultivada no Brasil, sendo responsável por aproximadamente 40% do volume da aquicultura nacional (ZIMMERMANN E HASPER, 2003; MARENGONI, 2006).

## **MÉTODO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR**

Para a realização de um estudo epidemiológico de sucesso e controle da columnariose, é essencial que se faça a distinção entre a *F. columnare* e as demais bactérias de pigmentação amarelada. Desse modo, a utilização de técnicas moleculares para a identificação da bactéria é imprescindível, uma vez que as técnicas bioquímicas atuais são geralmente não conclusivas.

O gene 16S rRNA apresenta tanto regiões altamente conservadas como variáveis em todos os procariotos, sendo que estas últimas têm sido utilizadas para prover informações taxonômicas em vários níveis de classificação e para distinção entre espécies (WEISBURG et al., 1991; JACQUET et al., 1992). Os primeiros nucleotídeos do terminal 5' do segmento 16 S rRNA contêm informação suficiente para se obter um

seqüenciamento e por isso são de interesse na análise molecular (LIESACK et al., 1997).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) permite a síntese de produtos altamente conservados nas subunidades 5S, 16S e 23S do ribossomo o que pode potencialmente diferenciar espécies e mostrar diferenças intraespecífica (WAKABAYASHI & TRIYANTO.,1999; FIGUEIREDO & LEAL, 2008). Essa técnica amplifica os segmentos de gene-alvo porque, geralmente este existe em níveis abaixo do mínimo detectável. Pode ser usada tanto na detecção como na identificação da bactéria ictiopatógena, incluindo: *A. hydrophilia*, *A. salmonicida*, *E. tarda*, *F. columnare*, *Renibacterium salmoninarum*, *Vibro anguillarum*, *V. vulnificus* e *Yersinia ruckeri* (BADER et al., 2003).

A *F. columnare* foi definitivamente identificada em cultura usando PCR primer espécie-específico baseados na seqüência do gene 16S rRNA que geraram produtos únicos, podendo ser diferenciados em gel de eletroforese (TOYAMA et al., 1996; BADER & SHOTTS, 1998). No entanto esse primer não era fácil de usar devido à formação de “hairpins” e “primer-dimers”, e não era sempre específico ou sensível o suficiente para dar um diagnóstico, devido à variação genômica intraespecífica.

Assim, visando o desenvolvimento de um meio menos invasivo e mais eficiente de diagnóstico da columnariose, BADER et al. (2003) desenharam um primer alternativo ao anterior, mas que contém menos estruturas secundárias e leva em conta a variação intragenética, obtendo sucesso ao poder identificar as *F. columnare* de todas as amostras.

O RFLP (Restriction Fragment Length Polimorphism) constitui uma das classes de marcadores moleculares mais amplamente utilizadas em genética. Uma adaptação dessa técnica, o PCR-RFLP, consiste em utilizar enzimas de restrição que cortam os fragmentos de DNA do gene de interesse amplificados por PCR, ocasionando clivagem de fragmentos distintos, gerando polimorfismos.

Após a digestão enzimática, os fragmentos gerados são separados por eletroforese em gel de agarose e analisados os padrões de bandas. Para que o polimorfismo seja detectado, é necessário que o padrão de polimorfismo do gene de

dois ou mais indivíduos comparados sejam distintos, pois as bandas observadas em uma mesma posição do gel possuem seqüências homólogas de nucleotídeos. Esse polimorfismo é gerado pela presença ou ausência de bases conhecidas e clivadas pelas enzimas de restrição, que pode variar entre indivíduos diferentes, ocasionando a clivagem de fragmentos diferentes, gerando polimorfismos (MARQUES, 2003).

Devido à ampla distribuição mundial da *F. columnare*, a variabilidade genética e fenotípica entre amostras de diferentes origens geográficas têm sido descritas na literatura:

Pela técnica de PCR-RFLP do gene 16S rRNA, DARWISH & ISMAIEL (2005) caracterizaram 27 estirpes de *F. columnare* podendo agrupá-las em três genótipos distintos; SOULE et al. (2005) confirmaram que *F. psychrophilum* é composta por pelo menos duas linhagens diferentes; FIGUEIREDO et al. (2005) caracterizou pela primeira vez estirpes de *F. columnare* em tilápias do Brasil; FLEMMING et al. (2007) puderam caracterizar isolados de *F. johnsoniae* em aqüicultura da África do Sul; SCHNECK & CASLAKE (2006) caracterizaram cepas de *F. columnare* nos EUA; assim como OLIVARES-FUSTER et al. (2007).

## **FORMAÇÃO DO BIOFILME**

Biofilme é um consórcio microbiano embutido numa massa de polissacarídeos extracelulares resultante da aderência, multiplicação e desenvolvimento de microrganismos sobre superfícies sólidas. Os microrganismos formam o biofilme como estratégia universal para otimizar a sobrevivência, ou seja, para perpetuar a espécie.

Bactérias presentes em biofilmes produzem exopolissacarídeos (EPS), seja, polímeros de carboidratos, que possibilitam vida livre a bactéria, permitindo a aderência e colonização de superfícies sólidas onde nutrientes se acumulam (COSTERTON et al., 1999).

Os EPS envolvem as membranas das células protegendo-as de estresses ambientais, e devido às cápsulas de natureza iônica, podem ajudar na fixação de minerais e nutrientes próximos à célula bacteriana (WEINER et al., 1995).

Os heteropolissacarídeos são polímeros ácidos, compostos de arranjos lineares de repetições de unidades de açúcares neutros e ácidos urônicos, bem como substituintes não carboidratados, tais como acetato, piruvato e succinato (WHITFIELD, 1988; RATTO et al., 2005).

Patógenos aquáticos de peixes como *Vibrio*, *Yersinia* e *Aeromonas* spp têm mostrado capacidade de formação de biofilme em ambientes aquáticos, sendo a sobrevivência de tais bactérias fora do tecido dos peixes hospedeiros altamente dependentes da estrutura do biofilme.

*Flavobacterium columnare*, *F. psychrophilum*, *F. branchiophilum*, *F. aquatile*, *F. johnsoniae*, *F. hydatis* e *F. succinicans* têm sido associados a doenças de peixes e também detectados às margens dos sistemas aquáticos, em formações de biofilmes, durante os surtos de epizootias.

Várias espécies de peixes servem como hospedeiros para as infecções bacterianas causadas pelas bactérias acima citadas, conduzindo a grandes perdas na aquicultura mundial. Tal fato tem aumentado o interesse no conhecimento da patogenicidade das espécies de *Flavobacterium* (BASSON et al., 2007).

As etapas no desenvolvimento de um biofilme são:

- Adesão a uma superfície: adesão de uma bactéria a uma superfície abiótica é, geralmente, mediada por interações inespecíficas (por exemplo, forças hidrofóbicas), enquanto que a adesão a um tecido vivo é normalmente mediada por mecanismos moleculares específicos de “ancoragem”, através de lectinas, ligandos ou adesinas. A adesão primária de um organismo a uma superfície é um processo reversível que envolve a aproximação deste à superfície, de forma aleatória ou através de mecanismos de quimiotaxia e de mobilidade. Quando o microrganismo atinge uma proximidade crítica da superfície, a ocorrência de adesão depende do balanço final entre forças atrativas e repulsivas geradas entre as duas superfícies. A repulsão entre duas superfícies pode ser

ultrapassada através de interações moleculares específicas mediadas por adesinas, que são proteínas localizadas em estruturas que irradiam da superfície celular.

- **Maturação do biofilme:** Após a adesão primária, as células fracamente ligadas consolidam o processo de adesão produzindo exopolissacarídeos que complexam os materiais da superfície. Na ausência de interferência mecânica ou química, a adesão torna-se, nesta fase, irreversível. Durante este estágio de adesão, os microrganismos individualizados ou planctônicos podem “colar-se” uns aos outros, formando agregados na superfície a que aderem. Após a adesão irreversível da bactéria à superfície, inicia-se o processo de maturação do biofilme. A densidade e complexidade do biofilme aumentam à medida que as células se dividem (ou morrem) e os componentes extracelulares gerados pelas bactérias interagem com moléculas orgânicas e inorgânicas do ambiente circundante para formar o glicocálix. Nesta fase, os biofilmes tornam-se altamente hidratados, formando-se estruturas abertas compostas por 73 a 98% de material não celular, incluindo exopolissacarídeo e canais por onde circulam os nutrientes. Fatores como o pH, difusão de oxigênio, fonte de carbono e osmolaridade controlam também a maturação do biofilme. Quando completamente maduro, o biofilme funciona como um consórcio funcional de células, com padrões de crescimento alterados, cooperação fisiológica e eficiência metabólica. Nesta fase, as células localizadas em regiões diferentes do biofilme exibem diferentes padrões de expressão genética.
- **Ruptura do biofilme:** Quando o biofilme atinge uma determinada massa crítica e o equilíbrio dinâmico é alcançado, as camadas mais externas do biofilme começam a libertar células em estado planctônico, que se podem rapidamente dispersar e multiplicar, colonizando novas superfícies e organizando novos biofilmes em novos locais. Com a ausência de nutrientes e/ou de oxigênio ou dificuldades na sua difusão, a diminuição do pH e a acumulação de metabólitos secundários tóxicos, inicia-se um processo de morte celular junto à superfície e subsequente desintegração do biofilme (GRUPO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DO IST, 2005).

O sistema de aqüicultura proporciona um habitat ideal para formação de biofilme pelas bactérias patógenas, pois apresenta rico fluxo de nutrientes, proximidade dos hospedeiros e ampla variedade de superfícies passíveis de colonização bacteriana.

O biofilme não é apenas um estágio importante na patogenicidade dos organismos, mas seu estabelecimento no tecido do hospedeiro ou superfícies inanimadas inibe a efetividade das terapias antimicrobianas, confere proteção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro e facilita a comunicação bacteriana, levando à expressão da virulência, fatores estes que criam um ambiente ideal e um nicho ecológico para os microrganismos instigarem epizootias ou a recorrência de infecções no ambiente da aqüicultura (BASSON et al., 2007).

A maneira pela qual as bactérias do gênero *Flavobacterium* formam o biofilme ainda não foi elucidada. Todavia, acredita-se que a adesão das mesmas ao substrato esteja relacionada com a quantidade de polissacarídeos constituintes, como a lectina. É provável que tais polissacarídeos aliados a presença de adesina, cápsulas e superfície hidrofóbica atuem no papel integral permitindo que as bactérias ataquem uma superfície biótica ou abiótica e formem o biofilme (RATTO et al., 2005; BASSON et al, 2007).

Alguns estudos sugerem que a produção de cápsula facilita a aderência bacteriana através de seus componentes biopolímeros, contribuindo para a formação de biofilme (PETERS & PULVERER, 1984).

Sabendo-se que os polissacarídeos microbianos são componentes integrais dos biofilmes, e que a matriz do mesmo varia amplamente dependendo das estruturas celulares presentes e das condições predominantes, uma alternativa ao controle das epizootias seria o desenvolvimento de métodos enzimáticos, impedindo a formação do biofilme nos estágios iniciais, e assim a infecção não se instalaria nos peixes em cultivo.

Métodos enzimáticos baseados em proteinases já estão em uso no caso de indústrias produtoras de papel. O lodo formado nos equipamentos leva à contaminações, inclusive do produto final e o uso de biocidas contem restrições. Assim, estruturas de proteínas estão envolvidas especialmente nos estágios iniciais de desenvolvimento do biofilme e a ligação inicial é geralmente estabilizada por polissacarídeos nos biofilmes maduros (RATTO et al., 2005).



Futuros métodos devem ser desenvolvidos para que haja a quebra dos depósitos estruturais e para tanto há a necessidade de maior conhecimento das estruturas dos polissacarídeos constituintes da célula em estudo.

## OBJETIVOS

- Isolamento de cepas de *Flavobacterium columnare* a partir de tilápia (*Oreochromis niloticus*), matrinxã (*Brycon cephalus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*), oriundos de diferentes pisciculturas da região do Estado de São Paulo, Brasil, e clinicamente diagnosticados como acometidos por columnariose pelo Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos (CAUNESP- Jaboticabal, SP);
- Caracterização bioquímica dos isolados de *F. columnare* através de kits para bioquímica bacteriana (Laborclin®);
- Caracterização molecular, por meio da técnica de PCR-RFLP, dos isolados bacterianos de *F. columnare*, tendo como controle as cepas de *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae* e como padrão, duas cepas de *F. columnare* pertencentes ao CAUNESP/UNESP Jaboticabal;
- Determinar fenotipicamente a presença ou ausência de cápsulas nas cepas de *F. columnare*, *A. hydrophila* e *S. agalactiae* por meio do teste Agar vermelho congo;
- Identificar os monossacarídeos componentes do exopolissacarídeo presente nas cepas de *F. columnare*, *A. hydrophila* e *S. agalactiae* por meio de cromatografia de alta eficiência.

## REFERÊNCIAS

- AMEND, D. F. Columnaris (*Flexibacter columnaris*) disease of freshwater fishes and a brief review of other flexibacterial diseases of fish. In: Antigenes of Fish Pathogens. p.139-161. **Symposium International de Talloires**, Collection foundation, Marcel Merieux, Lyon, 1982.
- ANGKA, S.L.; LAM, T.J.; SIN, Y.M. Some virulence characteristics of *Aeromonas hydrophila* in walking catfish (*Clarias gariepinus*). **Aquacult.**, v.130, p.103-112, 1995.
- ARIAS, CR., WELKER, TL., SHOEMAKER, CA., ABERNATHY, JW., KLESIUS, PH. Genetic fingerprinting of *Flavobacterium columnare* isolates from cultured fish. **J. App. Microbiol.**, vol. 97, no. 7, p. 421-428, 2004.
- AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. **Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish**. Chichester: Ellis Horwood, 364 p., 1989.
- BADER, J. A.; SHOEMAKER C. A.; KLESIUS, P. H. Rapid detection of columnaris disease in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) with a new species-specific 16S rRNA gene based PCR primer for *Flavobacterium columnare*. **J. Microbiol. Meth.**, v. 52, p. 209-220, 2003.
- BADER, J. A.; SHOEMAKER C. A.; KLESIUS, P. H. Rapid detection of columnaris disease in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) with a new species-specific 16S rRNA gene based PCR primer for *Flavobacterium columnare*. **J. Microbiol. Meth.**, v. 52, p. 209-220, 2003.
- BADER, J. A.; SHOTTS Jr, E. B. Identification of *Flavobacterium* and *Flexibacter* species by species specific polymerase chain reaction primers to the 16 S ribosomal RNA gene. **J. Aquat. Anim. Health**, v. 10, p. 311-319, 1998.
- BASSON, A., FLEMMING, L.A., CHENIA, H.Y. Evaluation of adherence, hydrophobicity, aggregation, and biofilm development of *Flavobacterium johnsoniae*-like isolates. **Microbial Ecol.**, vol 55, p. 1-14, 2007.

BERNADET, J. F.; SEGERS, P.; VANCANNEYT, M. et al. Cutting a Gordian Knot: emended classification and description of the Genus *Flavobacterium*, emended description of the Family *Flavobacteriaceae*, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov. (Basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978). **Int. J. Syst. Bacteriol.**, p. 128-148, 1996.

BERNARDET, J. F.; GRIMONT, P. A. D. Deoxyribonucleic acid relatedness and phenotypic characterization of *Flexibacter columnaris* sp. nov., nom. rev., *Flexibacter psychrophilius* sp. nov., nom. rev., and *Flexibacter maritimus*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, p. 346-354, 1989.

CARLSON, R. V.; PACHA, R. E. Procedure for the isolation and enumeration of myxobacteria from aquatic habitats. **Appl. Microbiol.**, v. 16, p. 795-796, May, 1968.

CHAGAS, E.C., VAL, A.L. Efeito da vitamina C no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de tambaqui. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 38, p. 397-402, 2003.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, p. 1318-1322, 1999.

DARWISH, A. M.; ISMAIEL, A. A. Genetic diversity of *Flavobacterium columnare* examined by restriction fragment length polymorphism and sequencing of the 16S ribosomal RNA gene and the 16S-23S rDNA spacer. **Mol. Cell. Probes**, v. 19, p. 267-274, 2005.

DARWISH, A. M.; ISMAIEL, A. A. Genetic diversity of *Flavobacterium columnare* examined by restriction fragment length polymorphism and sequencing of the 16S ribosomal RNA gene and the 16S-23S rDNA spacer. **Mol. Cell. Probes**, v. 19, p. 267-274, 2005.

DAVIS, H. S. A new bacterial disease of fresh water fishes. **U. S. Bur. Fish Bull**, v. 28, p. 261-280, 1922.

DURBOROW, R. M.; THUNE, R. L.; HAWKE, J. P.; CAMUS, A. C. Columnaris Disease: A bacterial infection caused by *Flavobacterium columnare*. **SRAC**, n. 479, 1998.

DURBOROW, R.M.; MITCHELL, A. J.; CROSBY, M.D. Ich (white spot disease). **SRAC Southern Regional Aquaculture Center**, v. 476, n. 1, p. 1-6, 1998.

FAO. State of World Aquaculture, **FAO Fisheries Department**. Rome, Italy. p.145, 2006.

FIGUEIREDO, H. C. P.; KLESIUS, P. H.; ARIAS, C. R.; EVANS, J.; SHOEMAKER, C. A.; PEREIRA Jr, D. J.; PEIXOTO, M. T. D. Isolation and characterization of strains of *Flavobacterium columnare* from Brazil. **J. Fish Dis.**, v. 28, p. 199-204, 2005.

FIGUEIREDO, H. S., LEAL, C. A. G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **R. Bras. Zootec.**, v.37, suplemento especial p.08-14, 2008.

FLEMMING, L., RAWLINGS, D., CHENIA, H. Phenotypic and molecular characterisation of fish-borne *Flavobacterium johnsoniae*-like isolates from aquaculture systems in South Africa. **Res. Microbiol.**, v.158, p. 18-30, 2007.

GARCIA, F. **Pacus *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dietas suplementadas com vitamina C e E e submetidos ao desafio por *Aeromonas hydrophila***. Dissertação (Mestrado) Centro de Aquicultura da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, 2005.

GARNJOBST, L. *Cytophaga columnaris* (Davis) in pure culture: a myxobacterium pathogenic to fish. **J. Bacteriol.**, v. 49, p. 113-128, 1945.

GÉRY, J. **Characoids of the world**. Neptune: Trop. Fish Hob. 672 p.,1977.

GRIFFIN, B. R. A simple procedure for identification of *Cytophaga columnaris*. **J. Aquat. Anim. Health**, v. 4, p. 63-66, 1992.

GRUPO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DO IST. Crescimento microbiano em biofilmes. Disponível em: <[HTTP://www.e-escola.pt](http://www.e-escola.pt)>, 2005. Acessado em 5 de janeiro de 2008.

HARDIE, J. M.; WHILEY, R. A. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. **J. Appl. Microb. Symp. Suppl.** v. 83, p. 1S-11Sm, 1997.

JACQUET, C.; AUBERT, S.; SOLH, N. E.; ROCURT, J. Use of rRNA gene restriction patterns for the identification of *Listeria* species. **Syst. Appl. Microbiol.**, v.15, p. 42-46, 1992.

JINU, T.S. E GOODWIN, E. Morphological and genetic characteristics of *Flavobacterium columnare* isolates: correlations with virulence in fish. **J. Fish Diseases**, vol. 27, no. 1, p. 29-35, 2004.

JOOSTE, P. J.; HUGO, C. J. The taxonomy, ecology and cultivation of bacterial genera belonging to the family Flavobacteriaceae. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 53, p. 81-94, 1999.

KAWAMURA, Y.; HOU, XG.; SULTANA, F.; MIURA, H.; EZAKI, T. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 45, n. 2, p. 406-408, 1995.

KILLIAN M. *Streptococcus* and *Lactobacillus*. In: Topley e Wilson's microbiology and microbial infections. Collier, L., Balows, A and Sussman, M. **Syst. Bacteriol.**. Balows, A.; Duerden B.I., Arnold (Hodder Headline Group),v.2, p. 635-658, 1998.

KUNTTU, H. M. T., SUOMALAINEN,L., JOKINEN,E. I., VALTONEN, E. T. *Flavobacterium columnare* colony types: Connection to adhesion and virulence? **Microbial Pathogenesis**, v. 46, p. 21–27, 2009.

LIESACK, W.; JANSSEN, P. H.; RAINEY, F. A.;WARD-RAINEY, N. L.; E. STACKEBRANDT, E. Microbial diversity in soil: the need for combined approach using molecular and cultivation techniques. In: Elsas J. D., Trevors J. T., (Editors), **Modern Soil Microbiology**, New York, p. 375-439, 1997.

LIU, G.Y.H.; NIZET, V. Extracelular virulence factors of group B Streptococci.**Frontiers of Bioscience**, n. 9, p. 1794-1802, 2004.

MARENGONI, N.Z. Produção de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (linhagem chitralada), cultivada em tanques-rede, sob diferentes densidades de estocagem. **Arch. Zootec.**, v. 55, n. 210, p. 127-138, 2006.

- MARQUES, E. K. **Diagnóstico Genético-Molecular**. Ed. ULBRA, Canoas, 372 p.,2003.
- NIZET, V. Streptococcal  $\alpha$ -hemolysins: genetic and role in diseases pathogenesis. **Trends in Microbiol.**, n. 10, p. 575-580, 2002.
- OLIVARES-FUSTER, O., KLESIUS, P. H., EVANS, J., ARIAS, C. R. Molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolates from fish. **J. Fish Dis.**, v.31, p.277-83, 2008.
- OLIVARES-FUSTER,O., SHOEMAKER,C.A, KLESIUS, P. H., ARIAS, C. R. Molecular typing of isolates of fish pathogen, *Flavobacterium columnare*, by single-strand conformation polymorphism analysis, **FEMS Microbiol Lett**, v.269, p. 63–69, 2007.
- ORDAL, E. J., AND R. R. RUCKER. Pathogenic myxobacteria. **Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine**, v. 56, p. 15-18, 1944.
- PETERS, G., PULVERER, G. Pathogenesis and management of *Staphylococcus epidermidis* 'plastic' foreign body infections. **J. Antimicrob. Chemother**, suplemento D, p. 67-71, 1984.
- PILARSKI, F.; ROSSINI, A.J.; CECCARELLI, P.S. Isolation and characterization of *Flavobacterium columnare* (Bernardet et al. 2002) from four tropical fish species in Brazil. **Braz. J. Biol.**, v. 68, n.2, p. 409-414, 2008.
- POST, G. **Fish health**. T. F. H. Publications, p.37-41, 1987.
- RATTO, M.; SUIHKO, M.-L.; SIIKA-AHO, M. Polysaccharide-producing bacteria isolated from paper machine slime deposits. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, vol. 32, p. 109-114, 2005.
- ROBERTS, R. J.; SOMMERVILLE, C. Diseases of tilapias. In: PULLINS, S. V.; LOWE-MAC CONNELL, R. H. (Eds.) **Biology and Culture of Tilapias**. Manilla: International Center for Living Aquatic Resources Management, p. 247-263, 1982.
- SALVADOR, R. **Imunização e inflamação por *Streptococcus agalactiae* em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com ração suplementada com parede celular de *Saccharomyces cerevisiae***. Tese (Doutorado) - Centro de Aquicultura da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP, 2008.

- SCHNECK, J. L. & CASLAKE, L. F. Genetic diversity of *Flavobacterium columnare* isolated from fish collected from warm and cold water. **J. Fish Dis.**, vol. 29, p. 245-248, 2006.
- SCHRECKENBERGER, P. C. Emended classification and description of the family Flavobacteriaceae and the Genus *Sphingobacterium*. **Clin. Microbiol. News**, v. 20, n. 14, p. 115-124, 1998.
- SHAMSUDIN, M. N.; PLUMB, J. A. Morphological, biochemical and physiological characterization of *Flexibacter columnaris* isolates from four species of fish. **J. Aquat. Anim. Health**, v. 8, p. 335-339, 1996.
- SOULE, M., LaFRENTZ, S., CAIN, K., LaPATRA, S., CALL, D.R. Polymorphisms in 16S rRNA genes of *Flavobacterium psychrophilum* correlate with elastin hydrolysis and tetracycline resistance. **Dis. Aquat. Org.**, v. 65, p. 209-216, 2005.
- STOSKOPF, M. K. **Fish medicine**. Philadelphia: Saunders, p269-277, 1993.
- TAVARES-DIAS, M., FRASCÁ-SCORVO, C.M.D., CAMPOS-FILHO, E., MORAES, F.R. Características hematológicas de teleósteos Brasileiros. Iv. Parâmetros Eritroleucométricos, trombométricos e Glicemia do matrinxã (*Brycon cephalus* Günther, 1869) (Osteichthyes: Characidae) **Ars Vet**, v. 15, p. 149-153, 1999.
- TOYAMA, T.; KITA-TSUKAMOTO, K.; WAKABAYASHI, H. Identification of *Flexibacter maritimus*, *Flavobacterium branchiophilum*, and *Cytophaga columnaris* by PCR targeted ribosomal DNA. **Fish Pathol.**, v.31, p. 25-31, 1996.
- TRIYANTO, A. K.; WAKABAYASHI, H. Genotypic diversity of strains of *Flavobacterium columnare* from diseased fishes. **Fish Pathol.**, v. 34, n. 2, p. 65-71, 1999.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Reference of 2002 U. S. catfish health and production practices**. Center for Epidemiology and Animal Health, Fort Collins, Colorado, p. 64-67, 2003.

VALENTI, W. C. Aquicultura sustentável. In: Congresso de Zootecnia, 12o, Vila Real, Portugal, 2002, Vila Real: **Associação Portuguesa dos Engenheiros Zootécnicos. Anais**, p.111-118, 2000.

VIEIRA, R. H. S. F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado**. São Paulo:Livraria Varela, 380p., 2003.

WAKABAYASHI, H. Effect of environmental conditions on the infectivity of *Flexibacter columnaris* to fish. **J. Fish Diseases**, v. 14, p.279-290, 1991.

WAKABAYASHI, H.;TRIYANTO, T. Genotypic diversity of strains of *Flavobacterium columnare* from diseased fish. **J.Fish Pathol.**, v. 34, p. 65-71, 1999.

WEINER, R., LANGILLE, S.; QUINTERO, E. Structure, function and immunochemistry of bacterial exopolysaccharides. **J. Ind. Microbiol.**, v15, p. 339-346, 1995.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 697-703, 1991.

WHITFIELD, C. Bacterial extracellular polysaccharides. **Canadian J. Microbiol.**, v. 34, p. 415-420, 1988.

ZIMMERMANN, S.; HASPER, T.O.B. Piscicultura no Brasil: o processo de intensificação da tilapicultura. In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 40, 2003, Santa Maria. Anais, SBZ. CD ROOM., 2003.



## **CAPÍTULO 2 - Isolamento e caracterização bioquímica e molecular de cepas de *Flavobacterium columnare* do Brasil.**

### **RESUMO**

As bactérias são organismos que possuem grande importância na piscicultura pelas doenças que provocam, gerando impacto econômico apreciável. Dentre elas destaca-se a *Flavobacterium columnare*, agente etiológico da columnariose, a qual tem ampla distribuição geográfica, sendo responsável por um elevado número de mortalidade em peixes de várias espécies, principalmente em condições intensivas de criação. Desse modo, o objetivo deste estudo foi isolar e caracterizar bioquimicamente e por PCR-RFLP do gene 16S rDNA de *F. columnare* em tilápia (*Oreochromis niloticus*), tambaqui (*Colossoma macropomum*) e matrinxã (*Brycon cephalus*) provenientes de várias regiões do Estado de São Paulo, Brasil e clinicamente diagnosticados com columnariose, buscando uma forma de diagnóstico mais rápida. Para o isolamento, foi realizada uma raspagem com “swab” estéril diretamente nas lesões características e no rim cefálico dos peixes e imediatamente semeado em meios de cultura próprios para *Flavobacterium*. Ao todo foram obtidos 37 isolados e a caracterização bioquímica, como absorção do vermelho Congo, produção de flexirrubina, produção de H<sub>2</sub>S, redução do nitrato e motilidade indica que os isolamentos podem ser classificados como *Flavobacterium columnare*. O DNA foi extraído, para em seguida, realização da PCR e corte com enzimas de restrição. O filograma gerado pela técnica de PCR-RFLP mostrou três principais ramificações entre os isolados de *F. columnare*. Portanto, a utilização da PCR-RFLP para a identificação da bactéria apresentou-se como ferramenta eficiente e mais rápida do que as técnicas bioquímicas atuais que são demoradas e geralmente não conclusivas.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Flavobacterium columnare*, PCR-RFLP, 16S rDNA.

## INTRODUÇÃO

A *Flavobacterium columnare*, responsável pela columnariose, é uma bactéria oportunista, de ampla distribuição geográfica e que compõe parte da microbiota normal da água, pele e brânquias dos peixes. É comumente observada nas pisciculturas de água doce e está descrita como agente causal de grande número de mortalidades em trutas, salmões, carpas, tilápias, percas, peixes siluriformes e outros (BERNARDET & GRIMONT, 1989).

A columnariose é caracterizada por pontos acinzentados ou áreas amareladas de erosão, geralmente envoltas por uma zona avermelhada hiperêmica na cabeça, superfície corporal e brânquias, locais de progressivas necroses, envolvendo a epiderme, derme e musculatura, resultando geralmente em infecções sistêmicas (DECOSTERE et al., 1999).

No Brasil, muitos surtos de columnariose têm sido observados, principalmente durante as mudanças de estações, quando a temperatura da água tem variação diária superior a 5° C, a qualidade da água está inadequada, com redução da concentração de oxigênio dissolvido, excesso de matéria orgânica e manejo excessivo. Além de ser um grave problema de sanidade, esta enfermidade diminui a produção, devido à elevada e rápida mortalidade dos alevinos, chegando até mesmo a dizimar cardumes e o não aproveitamento do produto pela indústria pelas lesões que acarreta. Apesar deste fato, poucos são os trabalhos existentes na literatura brasileira que abordam a columnariose (PILARSKI et al., 2008).

Dentre os vários peixes nativos brasileiros, ou não, que despertaram o interesse dos piscicultores devido ao crescimento rápido, boa conversão alimentar, facilidade de reprodução induzida e até por características apropriadas à pesca esportiva, selecionou-se para este trabalho a matrinxã (*Brycon cephalus*), uma espécie da subfamília Bryconinae proveniente da Bacia Amazônica (TAVARES-DIAS et al., 1999); o tambaqui (*Colossoma macropomum*), peixe teleósteo de água doce pertencente à ordem Characiformes, família Serrasalminidae (GÉRY, 1977), nativo das bacias do Amazonas, Orinoco e afluentes (CHAGAS & VAL, 2003); e a a tilápia do Nilo

(*Oreochromis niloticus*), que se tornou na última década a espécie mais cultivada no Brasil, sendo responsável por aproximadamente 40% do volume da aqüicultura nacional (ZIMMERMANN & HASPER, 2003; MARENGONI, 2006).

A caracterização molecular tem sido utilizada em estudos epidemiológicos para identificar diferentes genótipos de patógenos de uma forma segura e altamente eficiente, além ser mais rápida que os outros métodos. Os reconhecimentos da prevalência de genótipos particulares numa infecção e seus padrões podem ajudar a comunidade científica a desenvolver métodos mais eficazes no controle de ictiopatologias (DARWISH & ISMAIEL, 2005; OLIVARES-FUSTER et al., 2007; FIGUEIREDO & LEAL, 2008 ).

Vários trabalhos encontrados na literatura descreveram a variação genética existente entre cepas de *F. columnare* através de análise de PCR e RFLP (SONG et al., 1988; BERNARDET & GRIMONT, 1989; TOYAMA et al., 1996) em todo o mundo.

Assim, o objetivo deste estudo foi isolar e caracterizar bioquimicamente e molecularmente cepas de *Flavobacterium columnare* por meio da análise da variação intra-específica do gene 16S rDNA com base na técnica da PCR-RFLP de peixes com sinais clínicos característicos de columnariose provenientes de várias regiões do Estado de São Paulo (Brasil).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada, pertencente ao Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal. Enquanto que o isolamento das cepas de *Flavobacterium columnare* ocorreu no Laboratório de Ictiopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal.

## ISOLAMENTO BACTERIANO

A coleta de *F. columnare* foi efetuada a partir de 16 exemplares de peixes, sendo 06 tilápias (*Oreochromis niloticus*), 02 matrinxãs (*Brycon cephalus*) e 08 tambaquis (*Colossoma macropomum*), oriundos de diferentes pisciculturas da região do Estado de São Paulo, Brasil, e clinicamente diagnosticados como acometidos por columnariose pelo Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos (CAUNESP- Jaboticabal, SP).

Para o isolamento foi realizado um raspado com “swab” estéril nas lesões características e no rim dos peixes. Imediatamente o material foi semeado em meios de cultura (líquido e sólido) próprios para *F. columnare* modificado por PILARSKI et al., (2008) e incubados a 30°C.

Os isolados bacterianos foram cultivados em meio sólido, modificado por PILARSKI et al. (2008), composto por infuso de filé de peixe 100 mL; extrato de levedura (fermento Fleishemann) 5,0 mL; acetato de sódio 0,02 g; ágar 2,5 g, pH 6.8 e autoclavados a 121 °C por 15 min em volume de 100 ml, distribuídos em placas de Petri para semeadura e incubados por 48 h em estufa bacteriológica a 30 °C.

As colônias características foram inoculadas em erlenmeyers contendo 6.0 mL de meio líquido para isolamento de *F. columnare*, modificado por PILARSKI et al. (2008), composto por infuso de filé de peixe 100 mL, extrato de levedura 5 mL, acetato de sódio 0,02 g, pH 6,8, autoclavado a 121 °C por 15 min e incubadas a 30 °C por 48 h.

## CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

As provas bioquímicas para identificação dos isolados de *F. columnare* foram realizadas através de kits para bioquímica bacteriana (Laborclin®) e consistiram de desaminação do L-triptofano, fermentação da glicose, produção de gás, produção de H<sub>2</sub>S, descarboxilação da ornitina, indol, rhaminose, citrato, lisina, motilidade, presença de pigmento de flexirrubina, absorção do vermelho congo, redução do nitrato, TSI (Ágar

três açúcares e ferro), esculina, fermentação da glicose, manitol, inositol, arginina, sacarose, lisina, amido e catalase.

## EXTRAÇÃO DE DNA E PCR-RFLP

O DNA foi extraído segundo o método descrito por WILSON (1987), com modificações, o qual acrescenta lisozima para degradação da parede celular, proteinase K para degradação de proteínas, e solução de CTAB/NaCl e tratamento com RNase A no final do processo para purificação do DNA.

O DNA dos novos isolados de *F. columnare* foram analisados pela amplificação de sua região conservada 16S rRNA utilizando-se o método da PCR; como controle foram utilizadas duas cepas padrão de *F. columnare*, uma cepa de *Aeromonas hydrophila* e uma cepa de *Streptococcus agalactiae*, pertencentes ao acervo do Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos (CAUNESP - Jaboticabal/SP).

As sequências de oligonucleotídeos iniciadores utilizadas para a amplificação do gene da subunidade ribossomal 16S rDNA foram feitas de acordo com KUSKE et al. (1997), sendo: PAF 5'AGAGTTTAGTCCTGGCTCAG 3' (localização em *Escherichia coli*: bases 8 a 27) e PC5B 5' TACCTTGTTACGACTT 3' (localização em *E. coli*: bases 1507 a 1492), com tamanho aproximado de 1500 pb.

As reações de amplificação foram conduzidas em um volume de reação de 20  $\mu$ L contendo: 110 ng do DNA a ser amplificado; 0,5  $\mu$ L de solução de dNTPs (10 mM); 0,6  $\mu$ L de  $MgCl_2$  (1,25 mM); 2,0  $\mu$ L de solução tampão (10X) para reação de PCR; 1,0  $\mu$ L de cada um dos iniciadores (10 pmol/  $\mu$ L); 5,0 U de *Taq* polimerase e água destilada grau Milli Q (esterilizada previamente, q.s.p.). Todas as reações de amplificação realizadas foram montadas em tubos esterilizados, não contendo nenhum material genético.

O ciclo de amplificação foi realizado em um termociclador da marca MJ RESEARCH, Inc., modelo PTC-100 TM, equipado com circuito "Hot Bonnet". O programa consistiu inicialmente das seguintes etapas: 94°C por 2 min para

desnaturação, então 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 56 °C por 30 s, 72 °C por 1 min, seguido de uma extensão a 72 °C por 5 min e mantidos a 10 °C até a retirada dos tubos do termociclador.

Um volume de 5 µL dos produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, por 1 h e 30 min, a 90 V e corados com 5 µg/ml de brometo de etídio para visualização da banda de 1.500 pb. Em todas as eletroforeses foi adotada uma amostra de DNA de peso molecular conhecido ("1Kb ladder"), produzidos pela Fermentas, e que serviu como referência de migração eletroforética para cálculo dos pesos moleculares dos fragmentos obtidos nas PCRs.

Após visualização da banda na altura esperada, 03 µL do produto de PCR armazenado era utilizado nas reações de digestão com endonucleases de restrição, metodologia de acordo com instruções do fabricante. Foram utilizadas 05 enzimas de restrição, separadamente: *EcoRI*, *MboI*, *PstI*, *HhaI*, *HpaII*, (Tabela 1, Figura 1). Para visualização do perfil genético gerado pelo corte das endonucleases de restrição, suas reações foram submetidas à eletroforese nas exatas mesmas condições citadas acima.

A partir do polimorfismo de bandas de fragmentos gerados pelas reações de PCR com a utilização de enzimas de restrição (RFLP-PCR) foi realizada a montagem de uma matriz binária correlacionando os dados relativos à presença ou ausência de bandas.

Esta matriz serviu para a construção de uma tabela de similaridade genética e de um filograma pelo "software" FREETREE versão 0.9.1.50, utilizando o agrupamento UPGMA e o coeficiente de Jaccard, sendo sua visualização possibilitada com o auxílio do "software" TREEVIEW, bootstrap de 1000 vezes.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### ISOLADOS BACTERIANOS

O procedimento para o isolamento de *Flavobacterium columnare* a partir da coleta nas lesões da pele e rim cefálico dos peixes, permitiu a obtenção de 37 novos isolados, sendo que 22 foram provenientes de tambaqui, 07 de tilápia e 08 de matrinxã. Pelas características das colônias, aspectos da cultura e bioquimismo foram caracterizados como *F. columnare* (Tabela 2).

**Tabela 2.** Indicação, nome e origem dos novos isolados de *Flavobacterium columnare* provenientes da coleta em lesões da superfície corporal e rim cefálico de exemplares de tilápia, matrinxã e tambaqui naturalmente acometidos de columnariose.

<i>Indicação</i>	<i>Nome do isolado</i>	<i>Origem</i>
1	F3	RIM MATRINXÃ
2	F5	PELE TAMBAQUI
3	F7	PELE TAMBAQUI
4	F8	PELE TAMBAQUI
5	F9	PELE TAMBAQUI
6	F10	PELE TAMBAQUI
7	F11	PELE TAMBAQUI
8	F15	RIM MATRINXÃ
9	F16	RIM MATRINXÃ
10	F17	RIM TAMBAQUI
11	F18	PELE TAMBAQUI
12	F19	PELE TAMBAQUI
13	F20	PELE TAMBAQUI
14	F21	PELE TAMBAQUI
15	F22	PELE TAMBAQUI
16	F23	PELE TILÁPIA
17	F24	RIM TILÁPIA
18	F25	PELE MATRINXÃ
19	F26	PELE MATRINXÃ
20	F27	PELE MATRINXÃ
21	F28	PELE TAMBAQUI
22	F29	PELE TILÁPIA
23	F32	PELE TILÁPIA
24	F33	PELE TILÁPIA
25	F35	PELE TAMBAQUI
25	F36	PELE TILÁPIA
27	F37	PELE TAMBAQUI
28	F38	PELE TAMBAQUI
29	F39	PELE TAMBAQUI
30	F40	PELE TAMBAQUI
31	F41	PELE TAMBAQUI
32	F42	PELE TAMBAQUI
33	F43	PELE TILÁPIA
34	F45	PELE TAMBAQUI
35	F46	PELE MATRINXÃ
36	F47	PELE TAMBAQUI
37	F48	PELE MATRINXÃ

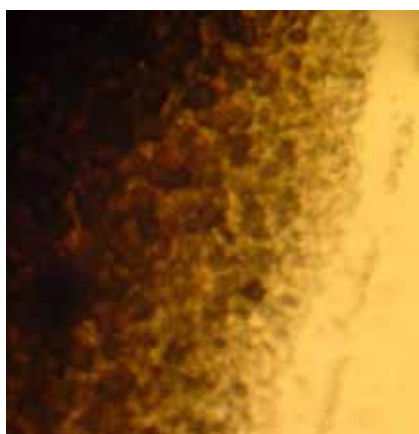


Pela análise das culturas, pode-se observar que em meio líquido, houve o desenvolvimento de bacilos finos, longos, móveis por deslizamento. Em meio sólido, as colônias eram pequenas, de coloração creme, com bordas em forma de raiz características desse gênero de *Flavobacterium* (Figuras 2 e 3).

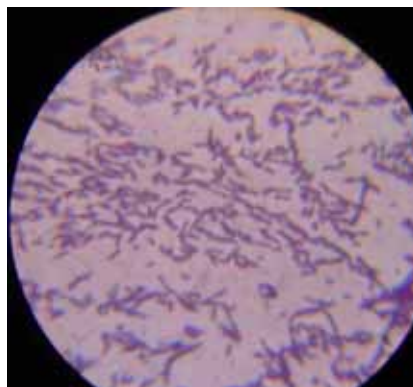
Por meio de coloração de Gram, os esfregaços apresentaram morfologia de bacilos finos, Gram negativos, agrupados em colunas (Figura 4).



**Figura 2.** Colônia de *Flavobacterium columnare* isolada de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) observada em microscópio óptico comum com aumento de 45X.



**Figura 3.** Colônia de *Flavobacterium columnare* isolada de tambaqui (*Colossoma macropomum*) observada em microscópio óptico comum com aumento de 45X.



**Figura 4.** Esfregaço de colônia de *Flavobacterium columnare* corada pelo método Gram e observada em microscópio óptico comum em aumento de 1000X.

Informações sobre ocorrência, patogenicidade e isolamento em cultura de *F. columnare* de peixes no Brasil são escassas. A maioria das publicações com o isolamento e caracterização desta bactéria é realizada em peixes de águas temperadas (PILARSKI et al., 2008).

A inexistência de um meio específico para *F. columnare* é outro entrave para o isolamento da bactéria. DECOSTERE et al. (1998) relataram a respeito da dificuldade para a obtenção de colônias puras.

Neste trabalho utilizou-se o meio de CARLSON & PACHA (1968) modificado por PILARSKI et al. (2008), que permitiu o bom desenvolvimento de colônias de *Flavobacterium*, como também prováveis cepas de *Aeromonas* e *Pseudomonas*, que cresceram sobrepostas. Isto exigiu inúmeras replicações a fim de se purificar as colônias da espécie desejada.

Não foi utilizado o antibiótico tobramicina para eliminar espécies contaminantes, como descrito por DECOSTERE et al. (1998), a fim de não induzir o aparecimento de formas L da bactéria (DAVIS et al., 1973).

As colônias puras de *F. columnare* foram estudadas quanto suas características morfofisiológicas e bioquímicas segundo o descrito por DECOSTERE et al. (1998) e moleculares (PCR-RFLP do gene 16S rDNA) segundo ARIAS et al. (2004) e FIGUEIREDO et al. (2005).

Em acordo com o descrito por PILARSKI et al. (2008), os 37 isolados deste trabalho apresentaram células em forma de bastonetes, gram-negativos, longos, delgados, aeróbios, com temperatura ótima de crescimento a 30°C.

Em meio líquido, os isolados apresentaram motilidade por deslizamento ao exame em gota pendente, e em meio sólido mostraram colônias de coloração cinza-amarelada, com bordas irregulares, em forma de raiz, não aderentes fortemente ao Agar, sendo semelhante ao obtido por SHAMSUDIN & PLUMB (1996), DESCOSTERE et al. (1998), e PILARSKI et al. (2008).

Para os autores BERNADET et al. (1989), GRIFFIN (1992), SHAMSUDIN & PLUMB (1996), DESCOSTERE et al. (1998) e PILARSKI et al. (2008), as culturas em meio sólido apresentaram propriedade organoléptica semelhante a cheiro de frutas, porém nos isolados deste trabalho, esta característica não foi perceptível.

## **PROVAS BIQUÍMICAS**

Após o diagnóstico presuntivo dos isolados (observação da morfologia das colônias e comportamento em gota pendente ao microscópio), foram realizadas 22 provas bioquímicas, e seus resultados estão explicitados na Tabela 3.

O teste do TSI evidenciou quatro comportamentos distintos entre os novos isolados, sendo que 49% dos isolados apresentou resposta alcalina e produção de H<sub>2</sub>S; 8% apresentou pequena fermentação, caráter alcalino e produção de H<sub>2</sub>S; 27% realizou fermentação anaeróbia e tem caráter alcalino e ácido no tubo de ensaio; e em 16% houve fermentação total.

Pôde-se observar grande variedade de comportamentos entre os vários isolados, todavia para os testes característicos da espécie *F. columnare* (motilidade, redução do nitrato, produção de flexirrubina, absorção do vermelho congo, fermentação da glicose e sacarose, desaminação do L-triptofano, hidrólise da gelatina e catalase) o resultado

positivo foi uniforme para todos, independente da espécie de peixe a qual foi coletada, fato também observado por PILARSKI et al. (2008).

A absorção do vermelho congo, que ocorreu em todos os isolados, é indicativa de produção de galactosamina glucan por *F. columnare* e tal fato é corroborado por BERNADET et al. (1989), GRIFFIN (1992), DECOSTERE et al (1999) e PILARSKI et al. (2008).

Todos os isolados deste trabalho foram positivos para a hidrólise da gelatina, e esta é uma das características principais da bactéria *Flavobacterium columnare*. Sabendo-se que a produção de determinadas enzimas promove a degradação de macromoléculas do meio, dentre elas a gelatina e como consequência há o clareamento do meio onde houve o crescimento bacteriano (BERNADET et al., 1989; GRIFFIN, 1992; PILARSKI et al., 2008).

O fato das amostras serem positivas para absorção do vermelho Congo, produção de flexirrubina, produção de H<sub>2</sub>S, redução do nitrato e motilidade sugere que os isolados podem ser classificados como *F. columnare* (Tabela 3).

Do total de 22 testes bioquímicos, que necessitaram de sete dias para sua realização, doze apresentaram 100% dos isolados com a mesma resposta para a característica, e o restante apresentou variações de resultados entre as cepas, portanto não pode ser tomado como padrão para identificação da espécie.

**Tabela 3.** Perfil bioquímico de cepas *Flavobacterium columnare* brasileiras, isoladas a partir de lesões da superfície corporal e rim cefálico de exemplares de tilápia, matrinxã e tambaqui naturalmente acometidos de columnariose.

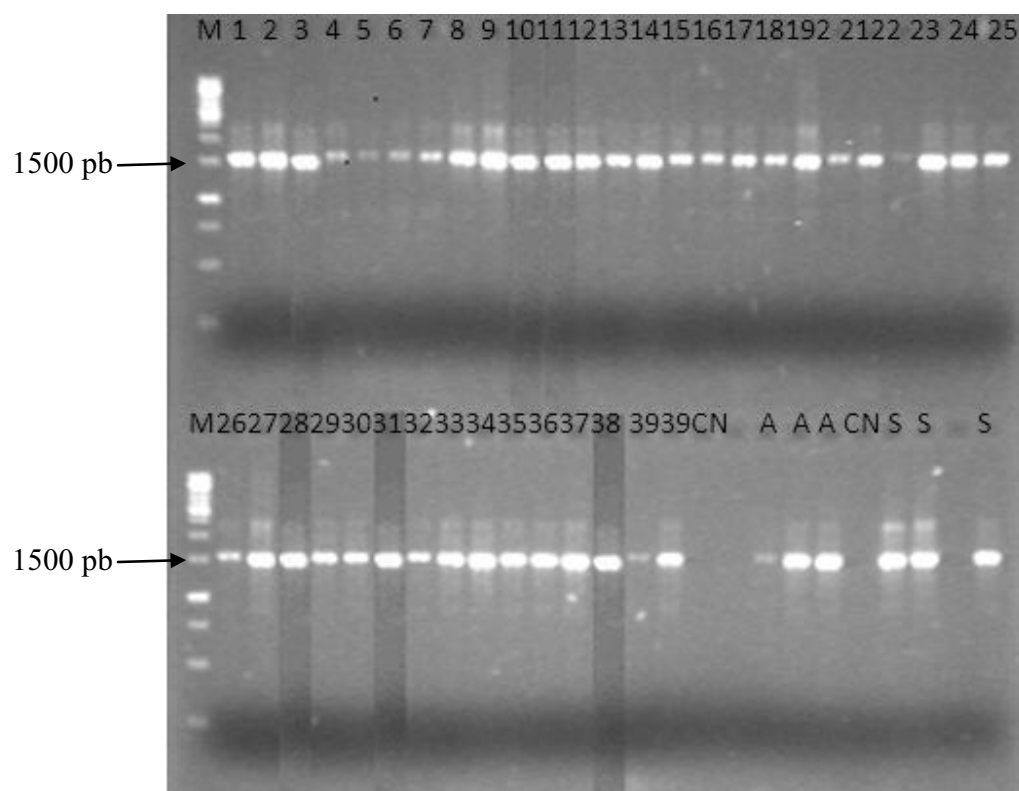
<b>Característica</b>	<b>Resultado</b>
<b>Amido</b>	<b>+ (19%) / - (81%)</b>
<b>Arginina</b>	<b>+ (92%) / - (8%)</b>
<b>Catalase</b>	<b>+ (100%)</b>
<b>Citrato</b>	<b>+ (43%) / - (57%)</b>
<b>Desaminação do L-Triptofano</b>	<b>+ (63%) / - (37%)</b>
<b>Descarboxilação da Lisina</b>	<b>+ (90%) / - (10%)</b>
<b>Descarboxilação da ornitina</b>	<b>+ (100%)</b>
<b>Esculina</b>	<b>+ (59%) / - (41%)</b>
<b>Fermentação da glicose</b>	<b>+ (100%)</b>
<b>Flexirrubina</b>	<b>+ (100%)</b>
<b>Gás a partir da glicose</b>	<b>- (100%)</b>
<b>Gelatina</b>	<b>+ (100%)</b>
<b>Gram</b>	<b>- (100%)</b>
<b>Indol</b>	<b>+ (100%)</b>
<b>Inositol</b>	<b>+ (89%) / - (11%)</b>
<b>Manitol</b>	<b>+ (89%) / - (11%)</b>
<b>Motilidade</b>	<b>+ (100%)</b>
<b>Produção de gás H<sub>2</sub>S</b>	<b>+ (66%) / - (34%)</b>
<b>Redução do nitrato</b>	<b>+ (100%)</b>
<b>Rhamnose</b>	<b>+ (10%) / - (90%)</b>
<b>Sacarose</b>	<b>+ (100%)</b>
<b>Vermelho Congo</b>	<b>+ (100%)</b>

+ Resultado positivo; - resultado negativo; +/- resultado positivo ou negativo varia dependendo da cepa.

## TÉCNICA DE PCR-RFLP

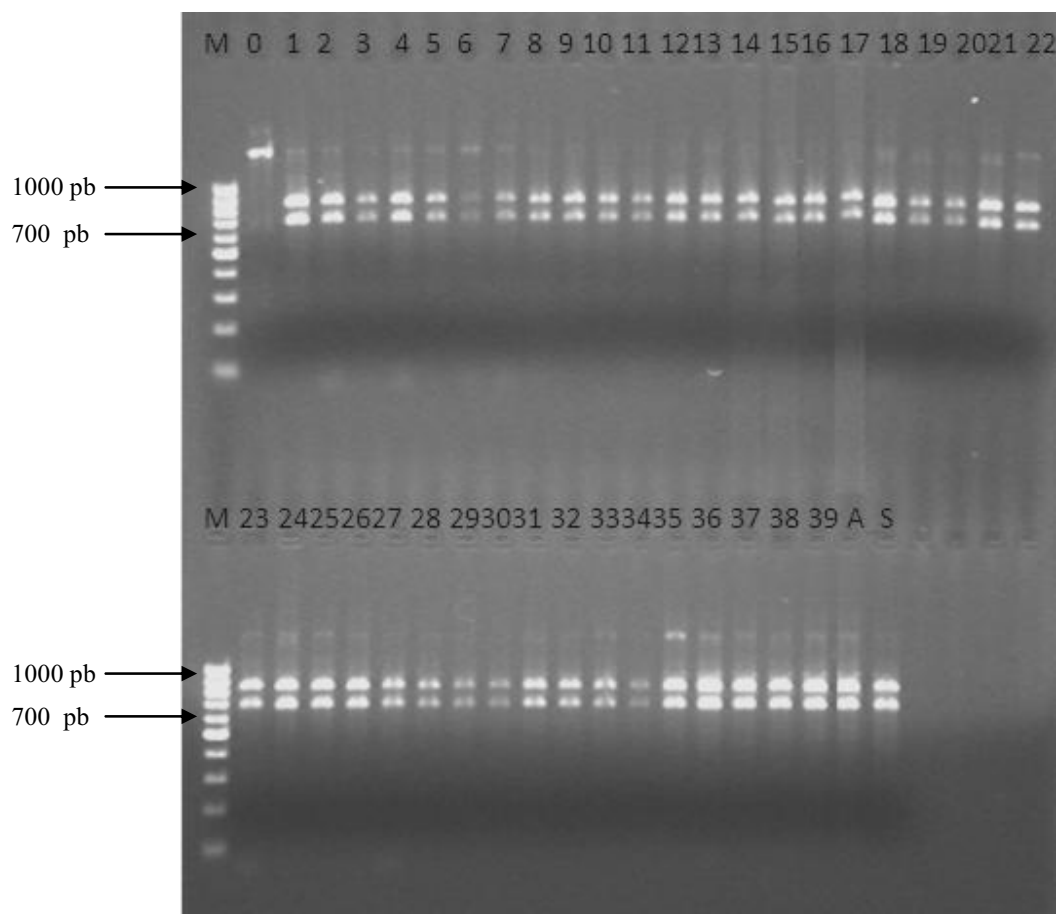
Dentre as técnicas moleculares, a PCR é sem dúvida, a ferramenta mais eficiente utilizada para o diagnóstico da columnariose. Inúmeros protocolos são aplicados, mas devido à falta de dados sobre o seqüenciamento do genoma da *F. columnare* de águas e hospedeiros de clima tropical, o uso de primers específicos para regiões conservadas do DNA bacteriano é o mais recomendado (BADER et al., 2003; DARWISH et al., 2004; FIGUEIREDO & LEAL, 2008).

Desse modo, buscando-se um teste mais rápido e conclusivo, recorreu-se a técnica da PCR-RFLP. As seqüências de nucleotídeos de aproximadamente 1500 pb foram amplificadas por meio dos iniciadores da região 16S rDNA dos 39 isolados de *F. columnare*, 01 de *A. hydrophila* e 01 de *S. agalactiae*. Todos os produtos da PCR foram analisados pela ausência e presença da banda com peso molecular do gene no gel de eletroforese. O gene 16S rDNA produz um produto com um único peso molecular, portanto os produtos amplificados apresentam um único fragmento no gel (Figura 6).



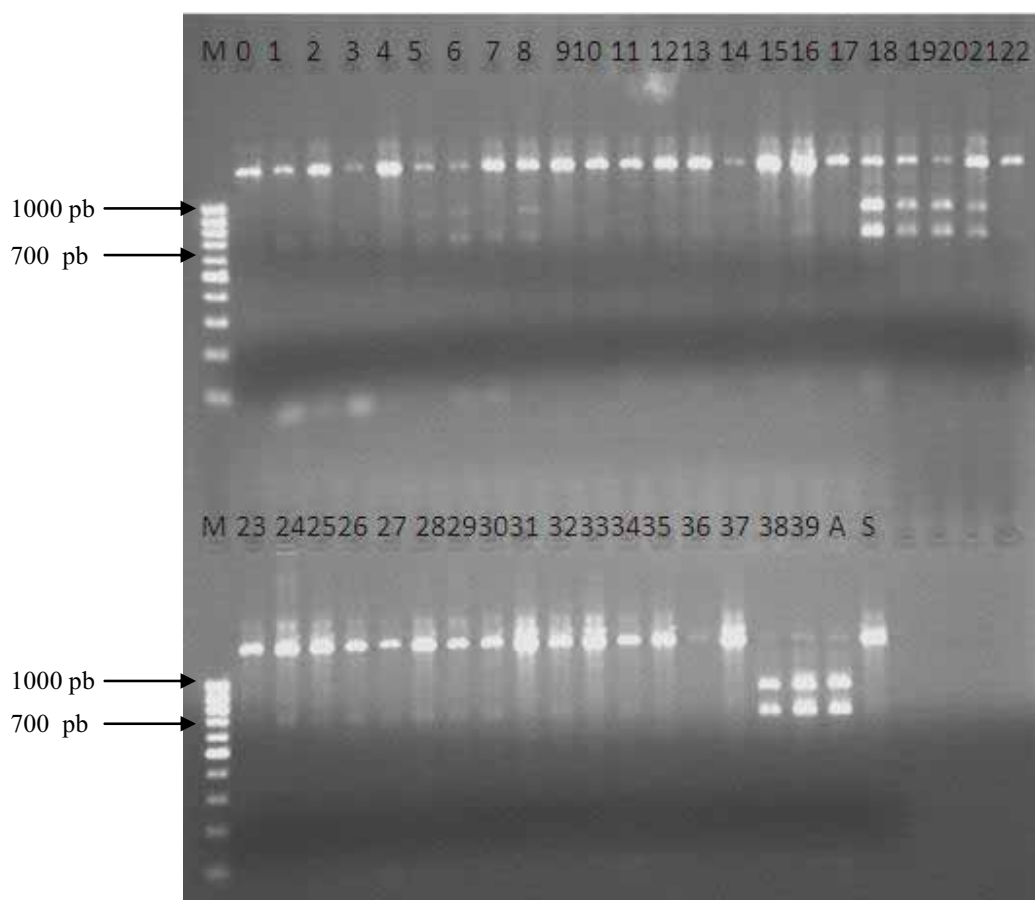
**Figura 6.** Eletroforograma dos produtos de PCR, cujos genes 16S rDNA foram amplificados com a utilização dos iniciadores universais 16S rDNA. M: marcador de tamanho molecular 1 kb DNA ladder; 1 ao 37: novos isolados de *F. columnare*; 38 e 39: cepas de *F. columnare* pertencentes ao CAUNESP/UNESP Jaboticabal; A: cepa de *Aeromonas hydrophila*; S: cepa de *Streptococcus agalactiae*; CN: controle negativo (água).

A restrição dos produtos amplificados com *EcoRI* gerou dois fragmentos entre 900 e 700 pb, mostrando similaridade para todos os materiais genéticos dos microrganismos analisados neste trabalho, de forma a se observar apenas um perfil genético, não possibilitando a sua diferenciação, mesmo para as cepas controle de *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* (Figura 7).



**Figura 7.** Perfil de restrição do gene 16S rDNA digerido com *EcoRI*. M refere-se ao marcador de tamanho molecular 100 pb DNA ladder; 0: DNA amplificado sem restrição; 1 ao 37: novos isolados de *F. columnare*; 38 e 39: cepas de *F. columnare* pertencentes ao CAUNESP/UNESP Jaboticabal; A: cepa de *Aeromonas hydrophila*; S: cepa de *Streptococcus agalactiae*.

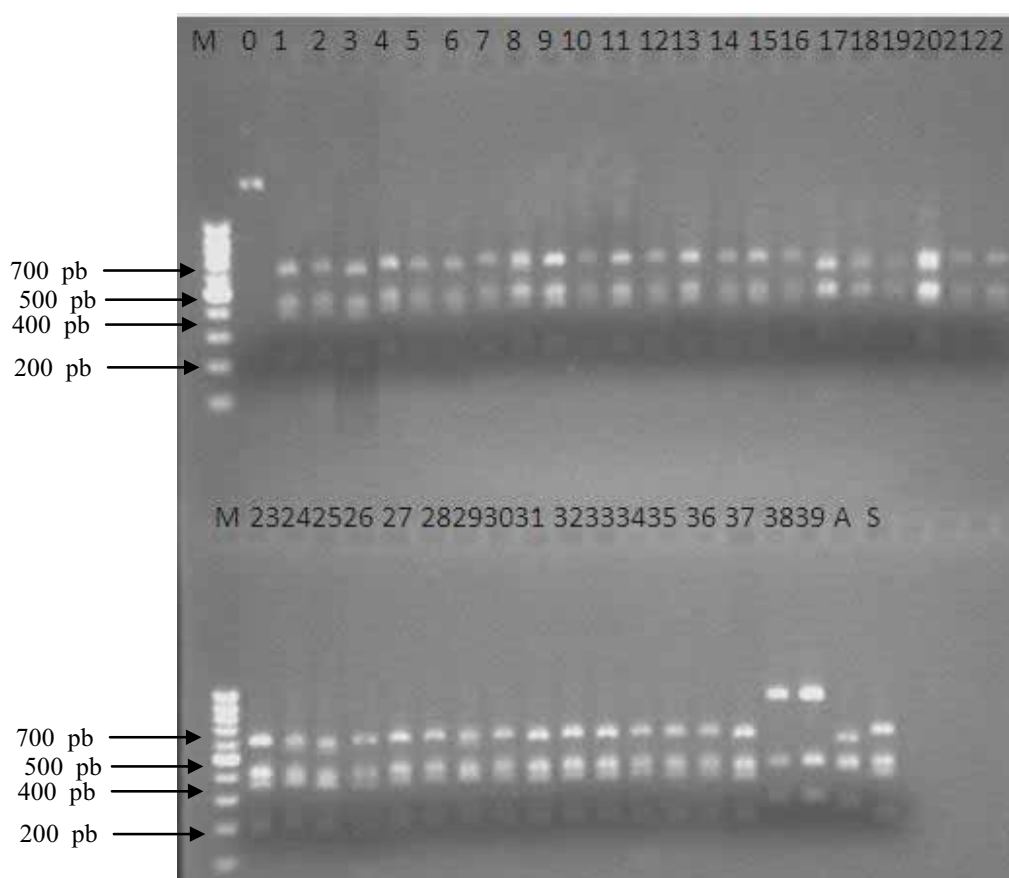




**Figura 8.** Perfil de restrição do gene 16S rDNA digerido com *Pst*I. M refere-se ao marcador de tamanho molecular 100 pb DNA ladder; 0: DNA amplificado sem restrição; 1 ao 37: novos isolados de *F. columnare*; 38 e 39: cepas de *F. columnare* pertencentes ao CAUNESP/UNESP Jaboticabal; A: cepa de *Aeromonas hydrophila*; S: cepa de *Streptococcus agalactiae*.

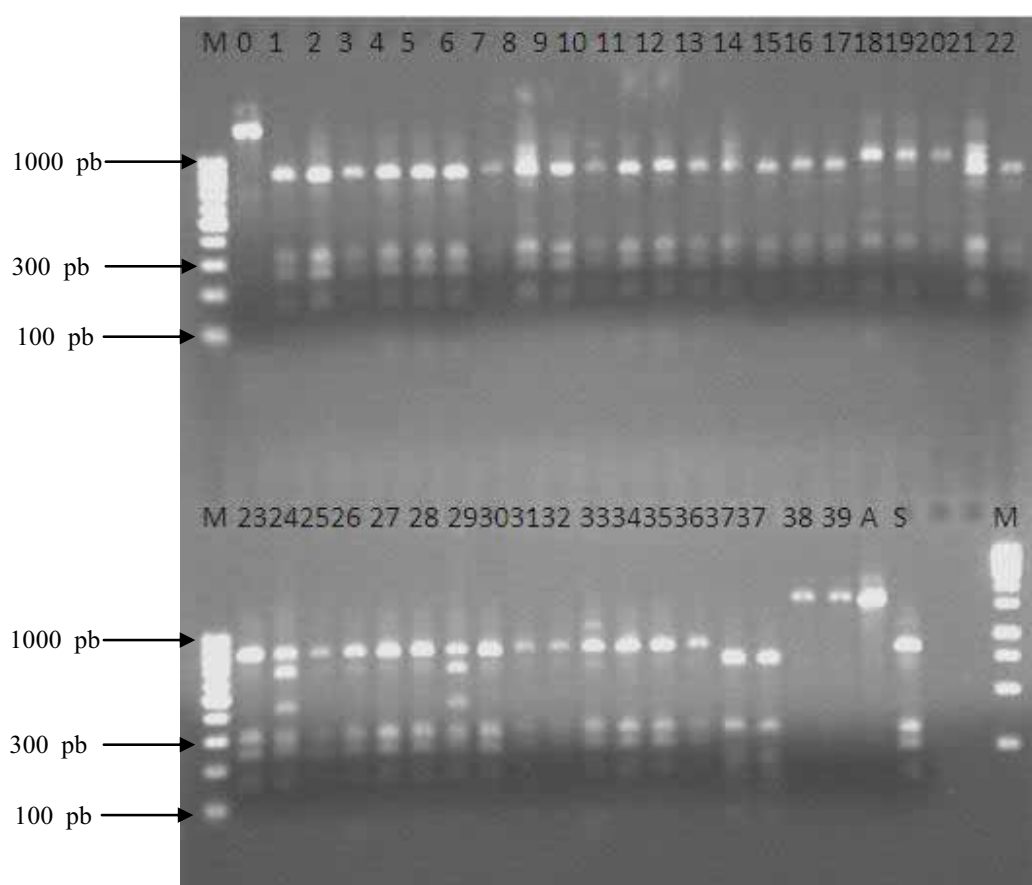
Já a restrição dos produtos amplificados com *Pst*I gerou dois fragmentos entre 1000 e 700 pb apenas nos isolados 7, 8, 9, 11, 19, 20, 21, 38 e 39 de *Flavobacterium columnare*. Os demais não sofreram clivagem por esta enzima (Figura 8), inclusive, fazendo-se uma simulação no software “pdraw32” em um gene 16S de *F. columnare* seqüenciado parcialmente (depositado em National Center of Genes and Genomes Information), a enzima *Pst*I não possui sítio de restrição para este gene, e o fato de a enzima ter encontrado sítio em alguns isolados representa uma mutação.

A restrição dos produtos amplificados com *HhaI* gerou quatro fragmentos entre 700 e 200 pb para os isolados de *F. columnare* (1 a 37), três fragmentos entre 1000 e 300 pb para as cepas 38 e 39 de *F. columnare*, três fragmentos entre 600 e 300 pb para a *A. hydrophila* e quatro fragmentos entre 700 e 200 pb para *S. agalactiae* de tamanhos moleculares semelhantes em relação aos de *F. columnare* (Figura 9).



**Figura 9.** Perfil de restrição do gene 16S rDNA digerido com *HhaI*. M refere-se ao marcador de tamanho molecular 100 pb DNA ladder; 0: DNA amplificado sem restrição; 1 ao 37: novos isolados de *F. columnare*; 38 e 39: cepas de *F. columnare* pertencentes ao CAUNESP/UNESP Jaboticabal; A: cepa de *Aeromonas hydrophila*; S: cepa de *Streptococcus agalactiae*.

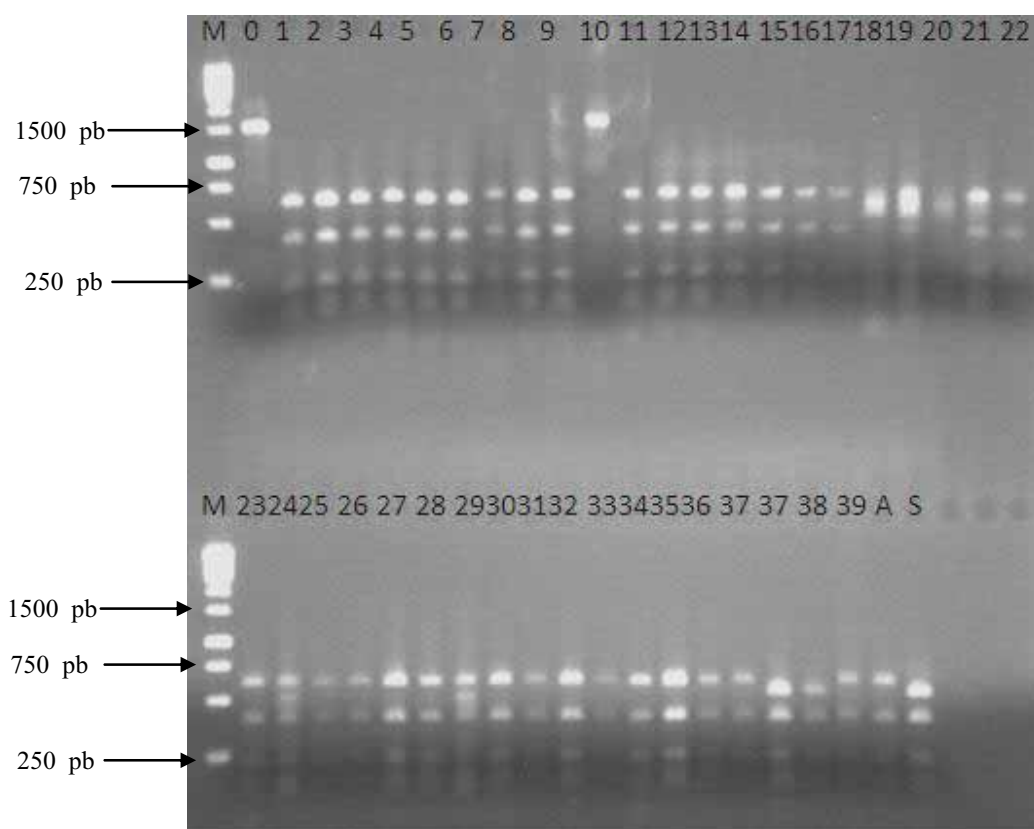
Em relação à restrição com *Mbol*, observou-se quatro fragmentos entre 1000 e 100 pb para os isolados novos de *F. columnare* (1 a 37), nenhuma clivagem para as cepas 38 e 39 de *F. columnare* e de *A. hydrophila* e quatro fragmentos para *S. agalactiae* de tamanhos moleculares distintos em relação aos de *F. columnare* (Figura 10).



**Figura 10.** Perfil de restrição do gene 16S rDNA digerido com *Mbol*. M refere-se ao marcador de tamanho molecular 100 pb DNA ladder; 0: DNA amplificado sem restrição; 1 ao 37: novos isolados de *F. columnare*; 38 e 39: cepas de *F. columnare* pertencentes ao CAUNESP/UNESP Jaboticabal; A: cepa de *Aeromonas hydrophila*; S: cepa de *Streptococcus agalactiae*.

Enquanto a restrição dos produtos amplificados com *HpaII* gerou quatro fragmentos entre 750 e 100 pb para os isolados de *F. columnare*, sendo que o perfil

genético deste último microrganismo difere dos demais na altura da banda próxima aos 750 pb. Assim, não há possibilidade de discernimento entre as espécies estudadas por meio da restrição desta enzima (Figura 11).



**Figura 11.** Perfil de restrição do gene 16S rDNA digerido com *HpaII*. M refere-se ao marcador de tamanho molecular 1 kb DNA ladder; 0: DNA amplificado sem restrição; 1 ao 37: novos isolados de *F. columnare*; 38 e 39: cepas de *F. columnare* pertencentes ao CAUNESP/UNESP Jaboticabal; A: cepa de *Aeromonas hydrophila*; S: cepa de *Streptococcus agalactiae*.

A análise do filograma (Figura 12) e da matriz de similaridade revela três principais ramificações entre os novos isolados de *F. columnare*, além do grupo padrão desta espécie, assim, a similaridade entre o grupamento I foi igual ou superior a 81%; no grupamento II, a similaridade foi maior ou igual a 93%; no grupamento III os isolados eram 94% ou mais similares; já no grupamento padrão de *F. columnare* (FI e FII), a

similaridade foi de 100%, dado que está de acordo com SEBASTIÃO et al., 2007 (dados não publicados) que por meio da técnica de RAPD-PCR, informou que ambas as cepas são 78% similares, semelhança suficiente para agrupá-las.

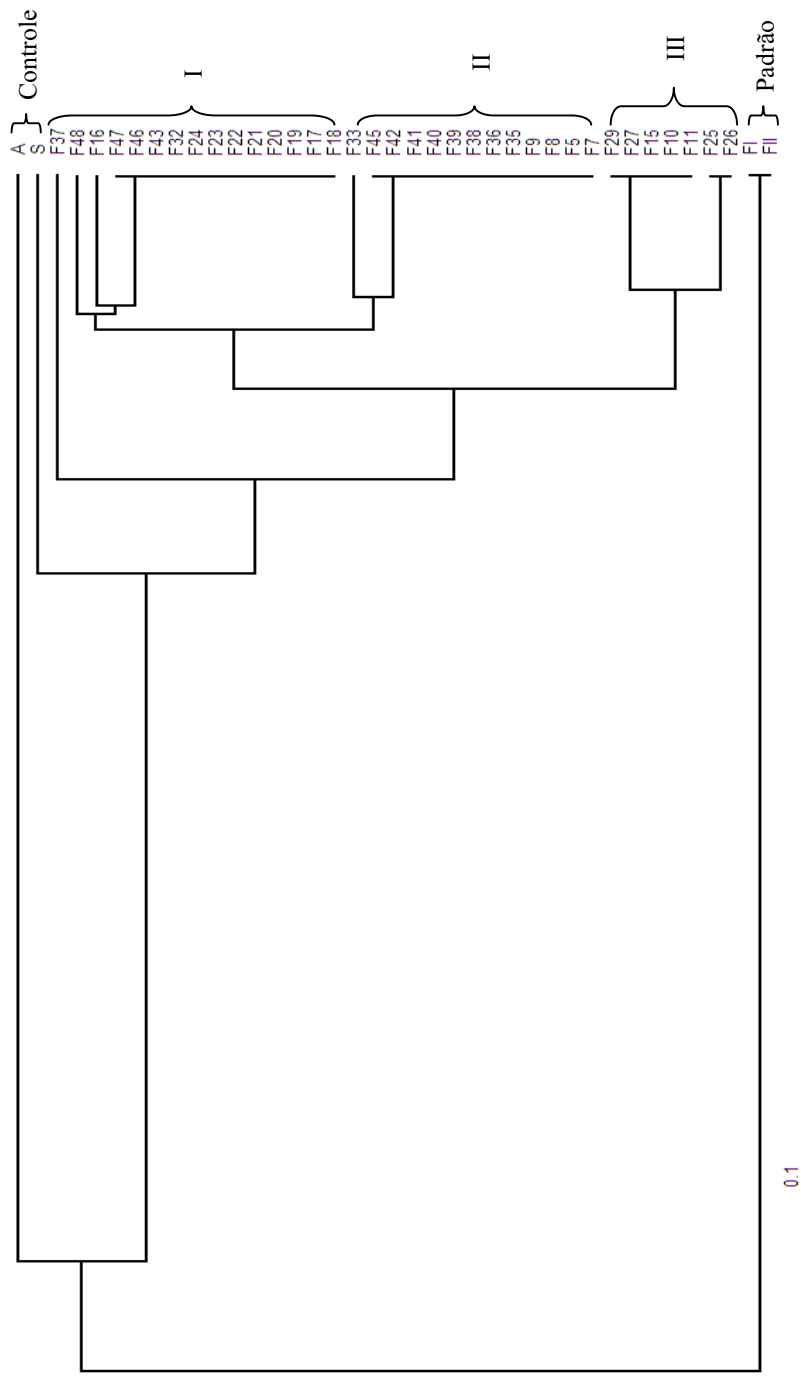
*Aeromonas hydrophila* diferiu do grupo I de *F. columnare* em média 65,5%; do grupo II, 58%; do grupo III, 55%; e do agrupamento padrão de *F. columnare* 73%. Enquanto *Streptococcus agalactiae* diferiu apenas 27%, em média, do grupo I de *F. columnare*; 21% em relação ao grupo II; 23% quanto ao grupo III; e 56% em relação ao agrupamento padrão de *F. columnare*. A diferença genética entre as cepas de *A. hydrophila* e *S. agalactiae* foi de 53%.

Vários autores encontraram variação intraespecífica entre os diversos isolados de *F. columnare* os quais estudaram. SHOEMAKER et al. (2007) encontraram dois subgrupos entre seus isolados usando a técnica de ISR-SSCP; ARIAS et al. (2004), DARWISH & ISMAIEL (2005) descreveram três subgrupos de *F. columnare* ao utilizarem PCR-RFLP; FLEMING et al. (2007) identificaram dois subgrupos de *Flavobacterium johnsoniae* por meio de PCR-RFLP com a enzima *HaeIII*.

Em relação à preferência de cada subgrupo de *F. columnare* às espécies de peixes estudadas, os resultados podem ser observados na Tabela 4. Apesar da amostra de peixes ser pequena (16 exemplares), pode-se fazer uma primeira tentativa de correlação entre os subgrupos genéticos de *F. columnare* encontrados e a espécie hospedeira, ou seja, tambaquis são mais susceptíveis aos subgrupos I e II de *F. columnare* brasileira e a matrinxã é mais sensível à colonização das cepas pertencentes ao subgrupo III da bactéria, nada se pode afirmar em relação ao grupo padrão, por se tratar de apenas 2 cepas de origens distintas. Relação semelhante também pôde ser feita por Olivares-Fuster et al. (2007), porém para espécies de clima temperado (EUA).

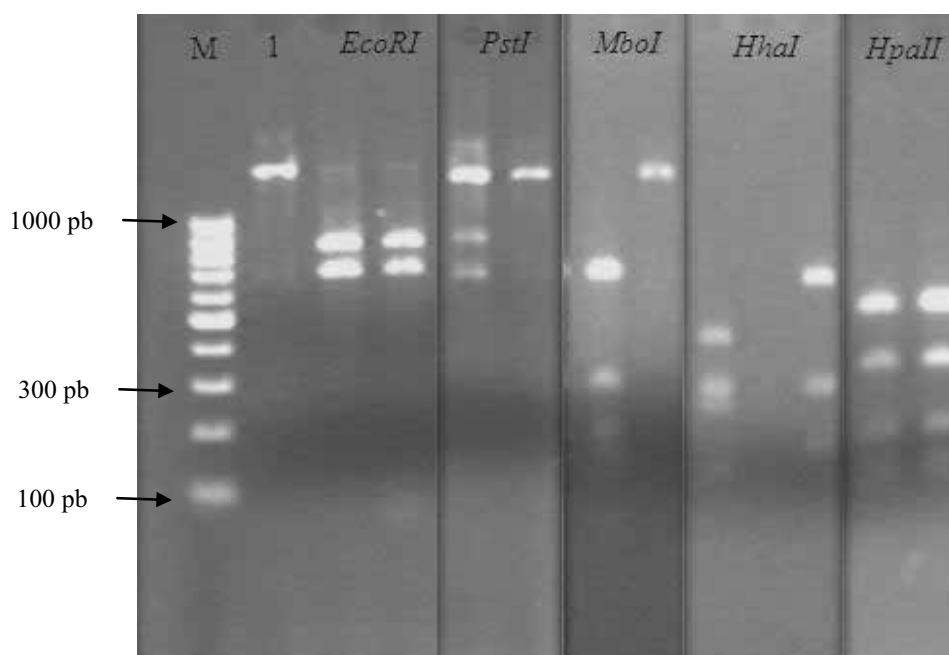
**Tabela 4.** Correlação dos novos isolados de *Flavobacterium columnare* divididos em três subgrupos genéticos distintos e a sua incidência nas espécies de peixes tambaqui, tilápia e matrinxã.

Subgrupo genético de <i>Flavobacterium columnare</i>	Tambaqui	Tilápia	Matrinxã
I	54%	31%	15%
II	83%	17%	-
III	29%	14%	57%



**Figura 12.** Filograma obtido pela análise dos produtos de PCR digeridos com as endonucleases de restrição *EcoRI*, *MboI*, *PstI*, *HhaI* e *HpaII* a partir de DNA dos novos isolados de *Flavobacterium columnare* (F3 ao F48), tendo como grupos controle as cepas padrão FI e FII de *F. columnare*, A de *Aeromonas hydrophila* e S de *Streptococcus agalactiae*, pertencentes ao CAUNESP/UNESP Jaboticabal.

Desse modo, utilizando-se a técnica de PCR-RFLP do gene 16S rRNA para identificação dos isolados de *F. columnare*, comparação com cepas já existentes e a diferenciação com cepas de *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae*, foi possível mapear perfis genéticos de cada microrganismo em relação a enzima de restrição aplicada (Figura 13).



**Figura 13.** Prancha contendo os polimorfismos encontrados pela técnica de PCR-RFLP do gene 16S rDNA, restrição com as enzimas *EcoRI*, *MboI*, *PstI*, *HhaI* e *HpaII* a partir de DNA de *Flavobacterium columnare*, isolados de matrinxã, tambaqui e tilápia naturalmente acometidos de columnariose; M refere-se ao marcador de tamanho molecular 1 kb DNA ladder; 1 refere-se ao gene amplificado, sem adição de enzimas de restrição.

As restrições dos produtos amplificados com *EcoRI* e *HpaII* mostraram apenas um perfil genético para as três espécies em questão, não possibilitando a sua diferenciação. Já a restrição com *PstI* permitiu a detecção de 2 perfis genéticos para *Flavobacterium columnare*.



Em relação à restrição com *Mbol*, observou-se 2 perfis genéticos de *F. columnare* e sua distinção em relação à *A. hydrophila* e à *S. agalactiae*. O mesmo se visualizou na restrição dos produtos amplificados com *Hhal*, porém não houve diferença com o perfil de *S. agalactiae*.

A amplificação da região do gene 16S rDNA e respectiva aplicação de RFLP com as enzimas *EcoRI*, *Mbol*, *PstI*, *Hhal* e *HpaII* foi uma técnica simples de ser realizada para a caracterização de grande número de isolados, todavia, os padrões RFLP produzidos dependem da variabilidade de sequências produzidas em determinadas regiões do gene, desde que os sítios de restrição das enzimas utilizadas tenham sequências específicas.

Os dados deste estudo revelam a variação genética existente dentro de um gene supostamente conservado, como é o caso do 16S rDNA, e com isso a justificativa da dificuldade de se estabelecer protocolos de diagnóstico para a caracterização molecular das espécies estudadas, além disso, a análise do filograma e das ramificações nele presentes, sugerem a existência de subespécies de *F. columnare*.

A dependência da técnica molecular utilizada em determinadas regiões do gene faz com que as comparações entre isolados de diferentes estudos sejam um desafio, a não ser que sejam utilizados métodos semelhantes nas análises (DARWISH & ISMAIEL, 2005).

## CONCLUSÃO

Assim, por meio dos 37 isolamentos obtidos das três espécies de peixes estudadas (matrinxã, tambaqui e tilápia do Nilo), verificou-se a existência de uma ampla diversidade genética de cepas de *F. columnare* tropicais, apesar da similaridade das características fenotípicas e bioquímicas das cepas. Para a aquicultura brasileira, este trabalho significa um primeiro passo na identificação das cepas de *F. columnare* existentes para um diagnóstico mais rápido e preciso e a correlação de seus três subgrupos genéticos com a espécie hospedeira.

## REFERÊNCIAS

- ARIAS, CR., WELKER, TL., SHOEMAKER, CA., ABERNATHY, JW., KLESIUS, PH.. Genetic fingerprinting of *Flavobacterium columnare* isolates from cultured fish. **J. Appl. Microbiol.**, v. 97, p. 421-428, 2004.
- BADER, J. A.; SHOEMAKER C. A.; KLESIUS, P. H. Rapid detection of columnaris disease in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) with a new species-specific 16S rRNA gene based PCR primer for *Flavobacterium columnare*. **J. Microbiol. Meth.**,v. 52, p. 209-220, 2003.
- BERNARDET, J. F.; GRIMONT, P. A. D. Deoxyribonucleic acid relatedness and phenotypic characterization of *Flexibacter columnaris* sp. nov., nom. rev., *Flexibacter psychrophilius* sp. nov., nom. rev., and *Flexibacter maritimus*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 39, p. 346-354, 1989.
- CARLSON, R. V.; PACHA, R. E. Procedure for the isolation and enumeration of myxobacteria from aquatic habitats. **J. Appl. Microbiol.**, v. 16, p. 795-796, 1968.
- CHAGAS, E.C., VAL, A.L. Efeito da vitamina C no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de tambaqui. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 38, p. 397-402, 2003.
- DARWISH, A. M., ISMAIEL, A. A., NEWTON, J. C. E TANG, J. Identification of *Flavobacterium columnare* by a species-specific polymerase chain reaction and renaming of ATCC 43622 strain to *Flavobacterium johnsoniae*. **Mol. Cell. Probes.**, v.18, p. 421-427, 2004.
- DARWISH, A. M.; ISMAIEL, A. A. Genetic diversity of *Flavobacterium columnare* examined by restriction fragment length polymorphism and sequencing of the 16S ribosomal RNA gene and the 16S-23S rDNA spacer. **Mol. Cell. Probes.**,v. 19, p. 267-274, 2005.

DAVIS, B. D., DULBECCO, R., EISEN, H. N., GINSBERG, H. S., BARRY W. W. **Infecções bacterianas e micóticas**. Microbiologia, São Paulo: EDART – São Paulo Ltda, p. 310-311, 1973.

DECOSTERE, A., HAESEBROUCK, F., DEVRIESE, LA. Characterization of four *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter columnaris*) strains isolated from tropical fish. **Vet. Microbiol.**, v. 62, p. 35-45, 1998.

DECOSTERE, A., HAESEBROUCK, F., CHARLIER, G., DUCATELLE, R. The association of *Flavobacterium columnare* strains of high and low virulence with gill tissue of black mollies (*Poecillia sphenops*). **Vet. Microbiol.**, v. 67, p. 287-298, 1999.

FIGUEIREDO, H. C. P.; KLESIUS, P. H.; ARIAS, C. R.; EVANS, J.; SHOEMAKER, C. A.; Pereira Jr, D. J.; Peixoto, M. T. D. Isolation and characterization of strains of *Flavobacterium columnare* from Brazil. **J. Fish Dis.**, v. 28, p. 199-204, 2005.

FIGUEIREDO, H. S., LEAL, C. A. G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **R. Bras. Zootec.**, v. 37, p. 08-14, 2008.

FLEMMING, L., RAWLINGS, D., CHENIA, H. Phenotypic and molecular characterisation of fish-borne *Flavobacterium johnsoniae*-like isolates from aquaculture systems in South Africa. **Res. Microbiol.**, v. 158, p. 18-30, 2007.

GÉRY, J. **Characoids of the world**. Neptune: Trop. Fish Hob. 672 p., 1977.

GRIFFIN, B. R. A simple procedure for identification of *Cytophaga columnaris*. **J. Aquat. Anim. Health.**, v. 4, p. 63-66, 1992.

KUSKE, C.R.; BARNS, S.M.; BUSCH, J.D. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions. **J. Appl. Env. Microbiol.**, v. 63, p. 3614–3621, 1997.

MARENGONI, N.Z. Produção de tilápia do nilo *Oreochromis niloticus* (linhagem chitralada), cultivada em tanques-rede, sob diferentes densidades de estocagem. **Arch. Zootec.**, v. 55, n. 210, p. 127-138, 2006.

OLIVARES-FUSTER, O.; BAKER, J.L.; TERHUNE, J. S.; SHOEMAKER, C. A.; KLESIUS, P. H.; ARIAS, C. R. Host-specific association between *Flavobacterium columnare* genomovars and fish species. **Syst. Appl. Microbiol.**, v.30, p. 624-633, 2007.

OLIVARES-FUSTER, O., SHOEMAKER, C.A, KLESIUS, P. H., ARIAS, C. R. Molecular typing of isolates of fish pathogen, *Flavobacterium columnare*, by single-strand conformation polymorphism analysis, **FEMS Microbiol. Lett.** v. 269, p. 63–69, 2007.

PILARSKI, F.; ROSSINI, A.J.; CECCARELLI, P.S. Isolation and characterization of *Flavobacterium columnare* (BERNARDET et al. 2002) from four tropical fish species in Brazil. **Braz. J. Biol.**, v. 68, p. 409-414, 2008.

SHAMSUDIN, M.N.; PLUMB, J. A. Morphological, biochemical and physiological characterization of *Flexibacter columnaris* isolates from four species of fish. **J. Aquat. Anim. Health.**, v. 8, p. 335-339, 1996.

SHOEMAKER, C.A., OLIVARES-FUSTER, O., ARIAS, C. R., KLESIUS, P.H. *Flavobacterium columnare* genomovar influences mortality in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **J. Vet. Microbiol.**, v. 127, p. 353-9, 2008.

SONG, Y.L., FRYER, J.L., ROHOVEC, J. S. Comparison of gliding bacteria isolated from fish in north America and other areas of The Pacific rim. **J. Fish Pathol.**, v.23, p. 197-202, 1998.

TAVARES-DIAS, M., FRASCÁ-SCORVO, C.M.D., CAMPOS-FILHO, E., MORAES, F.R. Características hematológicas de teleósteos Brasileiros. Iv. Parâmetros Eritroleucométricos, trombométricos e Glicemia do matrinxã (*Brycon cephalus* Günther, 1869) (Osteichthyes: Characidae). **Ars Vet**, v. 15, p. 149-153, 1999.

TOYAMA, T., KITA-TSUKAMOTO, K., WAKABAYASHI, H. Identification of *Flexibacter maritimus*, *Flavobacterium branchiophilum* and *Citophaga columnaris* by PCR targeted 16S ribosomal DNA. **J. Fish Pathol.**, v. 31, p. 25-31, 1996.

WILSON, K. Large scale CsCl preparation of genomic DNA from bacteria. In: Ausubel, F.M.R., Brent, R.E., Kingston, D.D., Moore, J.G., Seidman, J.A., Smith, K. Struhl ŽEds.,

**Cur. Prot. in Mol. Biol.** Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, NewYork, v. 2.4.3–2.4.5, 1987.

ZIMMERMANN, S. E HASPER, T.O.B. **Piscicultura no Brasil: o processo de intensificação da tilapicultura.** In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 40, 2003, Santa Maria. Anais, SBZ. CD ROOM, 2003.

### **CAPÍTULO 3 – Relação da presença de cápsula com a formação de biofilme em *Flavobacterium columnare* isoladas de peixes do Brasil.**

#### **RESUMO**

A *Flavobacterium columnare* é uma bactéria gram-negativa, cosmopolita, pertencente da microbiota normal da água, pele e brânquias dos peixes, e responsável pela columnariose. A doença se manifesta devido à má qualidade de água ou manejo zootécnico excessivo. Problemas associados com epizootias como esta incluem elevadas taxas de mortalidade, aumento na susceptibilidade de outras doenças e tratamento com custo oneroso. Sistemas aquícolas proporcionam um habitat ideal para formação de biofilme por essas bactérias patogênicas, pois apresentam rico fluxo de nutrientes, proximidade dos hospedeiros e ampla variedade de superfícies passíveis de colonização bacteriana, todavia os mecanismos de aderência ainda não foram elucidados. Uma alternativa ao controle das doenças seria o desenvolvimento de métodos enzimáticos que impedissem a formação do biofilme nos estágios iniciais, mas para tanto, há a necessidade de maior conhecimento das estruturas dos polissacarídeos constituintes da célula. Alguns trabalhos relacionam a produção de cápsula à formação de biofilme. Assim, este estudo buscou detectar fenotipicamente a formação de cápsulas em isolados de *F. columnare* pelo teste Agar vermelho congo, avaliar a composição do EPS quando produzido pelos isolados de *F. columnare* por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, e correlacionar os resultados destes testes. Resultados do trabalho mostram que a presença de cápsula na célula bacteriana não está diretamente relacionada à formação de biofilme, e o monossacarídeo preponderante em *F. columnare* é a glicose. São dados relevantes para futuros estudos que busquem métodos enzimáticos para impedimento da aderência e formação de biofilmes destes patógenos aquáticos em sistemas de aquicultura e conseqüentemente a prevenção da columnariose.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Flavobacterium columnare*, Agar vermelho congo, polissacarídeo extracelular.

## INTRODUÇÃO

A bactéria ictiopatogênica *Flavobacterium columnare*, responsável pela columnariose, é um bastonete Gram negativo longo, não flagelado, exibe motilidade por deslizamento em superfícies sólidas, apresenta temperatura de cultivo variando entre 4°C e 35°C, sendo 25°C o ótimo e é um patógeno oportunista (SCHNECK & CASLAKE., 2006; OLIVARES-FUSTER et al., 2007).

A columnariose destaca-se entre as enfermidades de etiologia bacteriana em sistemas de criação intensiva de tilápias (FIGUEIREDO & LEAL., 2008), causando substanciais perdas econômicas anualmente, uma vez que não há vacinas disponíveis, e tão pouco uma legislação para o uso de medicamentos nas pisciculturas brasileiras, estando o controle de epizootias baseado no manejo preventivo.

O gênero *Flavobacterium*, tais como *F. columnare*, *F. psychrophilum*, *F. branchiophilum*, *F. aquatile*, *F. johnsoniae*, *F. hydatis* e *F. succinicans* tem sido detectado às margens dos sistemas aquáticos, em formações de biofilmes, durante surtos de epizootias, uma vez que estes sistemas proporcionam um habitat ideal para formação de biofilme pelas bactérias patogênicas, pois apresentam rico fluxo de nutrientes, proximidade dos hospedeiros e ampla variedade de superfícies passíveis de colonização bacteriana, porém dados sobre o mecanismo de aderência ainda são escassos.

Sabe-se que bactérias presentes em biofilmes produzem exopolissacarídeos (EPS), ou seja, polímeros de carboidratos, que possibilitam vida livre a bactéria, permitindo a aderência e colonização de superfícies sólidas onde nutrientes se acumulam (COSTERTON et al., 1999). Os EPS envolvem as membranas das células protegendo-as de estresses ambientais, e devido às cápsulas de natureza iônica,

podem ajudar na fixação de minerais e nutrientes próximos a célula bacteriana (WEINER et al., 1995).

O biofilme não é apenas um estágio importante na patogenicidade dos organismos, mas seu estabelecimento no tecido do hospedeiro ou superfícies inanimadas inibe a efetividade das terapias antimicrobianas, confere proteção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro e facilita a comunicação bacteriana, levando à expressão da virulência, fatores estes que criam um nicho ecológico para os microrganismos instigarem epizootias ou a recorrência de infecções no ambiente da aquicultura (BASSON et al., 2007).

Uma alternativa ao controle das doenças seria o desenvolvimento de métodos enzimáticos que impedissem a formação do biofilme nos estágios iniciais, e assim a infecção não se instalaria nos peixes em cultivo. No entanto, para isso há a necessidade de maior conhecimento das estruturas dos polissacarídeos constituintes da célula em estudo.

Assim, os objetivos deste trabalho foram detectar fenotipicamente a formação de cápsulas em isolados de *Flavobacterium columnare*, utilizando-se como controle para caracterização de espécies distintas, as cepas de *Streptococcus agalactiae* e *Aeromonas hydrophila*; avaliar a composição em monossacarídeos do EPS bruto produzido pelos isolados de *F. columnare* e compará-los com os de *A. hydrophila*, com o uso da química de marcação dos monômeros com 1-fenil-3-metil-5-pirazolone (PMP); e correlacionar os dados destes testes.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram utilizados 39 isolados de *Flavobacterium columnare* provenientes do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada, pertencente ao Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal; e como controles, 01 cepa de



*Aeromonas hydrophila* e 01 cepa de *Streptococcus agalactiae*, ambas pertencentes ao Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Centro de Aqüicultura da UNESP (CAUNESP – Jaboticabal, SP).

### **TESTE ÁGAR VERMELHO CONGO (CRA)**

Para detecção da formação de cápsula utilizou-se o método semeadura em Agar Vermelho Congo (CRA), segundo descrito por FREEMAN et al. (1989), com modificações. O corante vermelho congo tem função de indicador de alterações no pH, apresentando coloração enegrecida entre os valores de pH 3,0 a 5,2.

Todas as cepas de *F. columnare*, *A. hydrophila* e *S. agalactiae* foram semeadas em placas de Petri contendo CRA (0,8g de corante vermelho congo, 1L de BHI- Brain Heart Infusion – HIMEDIA LABORATORIES; 50 g sacarose – MERCK, autoclavado).

Em seguida, as bactérias foram incubadas a 30 °C, por 24 h em estufa bacteriologia, seguido por mais 48h a temperatura ambiente para a detecção qualitativa da formação de biofilme.

### **PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS (EPS)**

Os isolados de *F. columnare* e a cepa controle de *A. hydrophila* foram semeados, cada um, em 10 placas de Petri contendo meio TSA (Tryptic Soy Agar – Biolife), incubados por 10 dias a 30°C. Após o período de incubação, as células foram raspadas e dissolvidas em 25 mL de solução salina 0,85 %, levemente homogeneizadas por 30 a 45 s e centrifugadas a 14.700 xg por 40 min para a sedimentação das mesmas. Os polissacarídeos foram precipitados por meio da adição, ao filtrado da cultura, de três volumes de álcool etílico 96° gelado. Esta mistura foi novamente centrifugada a 14.700 xg por 20 min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado passou por um período de secagem, em temperatura ambiente, por cinco dias.

O conteúdo total de carboidratos contidos no EPS precipitado foi determinado pelo método do ácido fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), usando glicose como padrão. A composição de monossacarídeos foi determinada por HPLC após hidrólise com 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 100°C por 3 h.

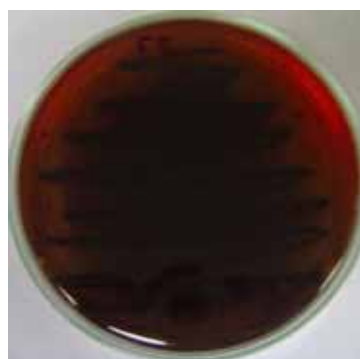
Após hidrólise, os EPS e os monossacarídeos padrões foram pré-derivatizados (marcação química) com PMP. As reações foram conduzidas em eppendorfs, acrescentando-se em cada tubo, 40 µl de solução PMP (0,5 mol/L em metanol) e 40 µl de solução de hidróxido de sódio (0,3 mol/L). Os tubos foram agitados e incubados a 70°C por 2 h. Após resfriamento à temperatura ambiente, a mistura foi neutralizada pela adição de 40 µl de solução de ácido hidrocloreídrico (0,3 mol/L). Para a extração dos derivados de monossacarídeos, foram adicionados 0,5 mL de éter butílico, sendo os tubos agitados por 5 s. As fases foram separadas por centrifugação a 5000 xg por 5 min e a fase superior (orgânica) foi removida e descartada. Este procedimento de extração foi repetido três vezes, e a fase aquosa resultante foi misturada com 400 µl de água mili-Q.

As análises dos monossacarídeos marcados com PMP foram desenvolvidas num sistema para CLAE equipado com um detector UV/VIS (Shimadzu, modelo SPD-M10A). O comprimento de onda para detecção foi de 245 nm. A separação dos monossacarídeos derivados com PMP foi realizada através de uma coluna GHRC ODS-C-18 (4,6 mm i.d. X 15 cm) com velocidade de fluxo constante de 0,5 mL/min e usando os tampões A e B, constituídos por 100 mmol/L de acetato de amônio e pH 5,5, com 10% de acetonitrila, e 25%, respectivamente. O gradiente para a separação foi: 0% de B, 30 min e 0 a 100% de B, até 100 min. A quantidade do padrão injetado foi de 20 µl.

Para quantificação das amostras foi construída uma curva de quantificação utilizando D-glicose, manose, ramnose, D-galactose, ácido galacturônico e ácido glucurônico (CAMPANHARO, 2006; CASTELLANE & LEMOS, 2007).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste do Agar vermelho congo revelou os dois comportamentos esperados em relação à coloração das colônias semeadas de *A. hydrophila*, *F. columnare* e *S. agalactiae*, ou seja, colônias rugosas e enegrecidas indicando presença de cápsula, e colônias lisas e vermelhas, que são aquelas que não possuem cápsula. (Figuras 1e 2).



**Figura 1.** Placa de Petri contendo Agar vermelho congo semeada com *Flavobacterium columnare* isolada de tabaqui, exibindo colônia enegrecida após 24 h de incubação a 30°C, indicando resultado positivo para produção de cápsula.



**Figura 2.** Placa de Petri contendo Agar vermelho congo semeada com *Flavobacterium columnare* isolada de tabaqui, exibindo colônia avermelhada, com pontos escuros após 24 h de incubação a 30°C, indicando resultado negativo para produção de cápsula.

Dos 39 isolados de *Flavobacterium columnare*, 49% apresentaram resposta positiva ao teste CRA e 51%, negativa. Já as cepas controle de *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* foram positivas para a presença de cápsula.

Isolados de *Flavobacterium spp* têm sido identificados em diversas estruturas de biofilmes, mas os mecanismos de aderência ainda não foram elucidados. A ausência de estruturas convencionais associadas à formação de biofilme, tais como fímbrias, pili, e flagelos sugerem que superfícies hidrofóbicas, e/ou auto-agregação e co-agregação podem imprimir um papel importante na aderência e formação do biofilme (BASSON et al., 2007).

Além disso, acredita-se que a adesão das mesmas ao substrato esteja relacionada com a quantidade de polissacarídeos constituintes, como a lectina. É provável que tais polissacarídeos aliados a presença de adesina, cápsulas e superfície hidrofóbica atuem no papel integral permitindo que as bactérias ataquem uma superfície biótica ou abiótica e formem o biofilme (MØLLER et al., 2003).

Dentre os isolados CRA positivos de *F. columnare*, 31,5% apresentaram formação de EPS e 68,5% não; dentre os negativos quanto ao CRA, 35 % foram capazes de produção de biofilme, e 65% foram negativos também para produção de biofilme. A cepa de *A. hydrophila* é positiva para produção de cápsula e de biofilme. A cepa de *S. agalactiae* é positiva para a produção de cápsula, porém não se desenvolveu em meio TSA, portanto não foi possível a extração de EPS desta cepa.

Alguns estudos relacionados à *Staphylococcus* coagulase-positivos informam que a produção de cápsula facilita a aderência bacteriana através de seus componentes biopoliméricos, contribuindo para a formação de biofilme (PETERS & PULVERER, 1984; FREEMAN et al., 1989). Todavia, os dados deste trabalho contrapõem esta afirmação, pelo menos no que se diz respeito aos isolados de *Flavobacterium columnare*, ou seja, a formação de biofilme não está diretamente relacionada à presença de cápsula na célula bacteriana, sendo este o primeiro estudo que avalia este parâmetro para isolados de *F. columnare*.

Os EPSs produzidos pelas cepas de *F. columnare* consistiram predominantemente de glicose e ácido glucurônico, com traços de galactose, manose e

ramnose; já na cepa de *A. hydrophila* houve predominância de ramnose e ácidos urônicos, com traços de glicose, galactose e manose (Tabela 1). Os perfis cromatográficos representativos podem ser visualizados no APÊNDICE.

**Tabela 1.** Composição, em monossacarídeos, dos exopolissacarídeos produzidos por cepas de *Flavobacterium columnare* (referidas como F7, F9, F15, F16, F19, F27, F29, F32, F33, F36, F41, F43, F48) e *Aeromonas hydrophila* (referida como A), cultivadas em meio de cultura TSA, por 10 dias, a 30°C.

Amostras	Manose	Ramnose	Acido glucurônico (mg/L)	Ácido galacturônico	Glicose	Galactose
F7	0,005	0,003	0,011	*	0,006	0,006
F9	0,005	0,002	0,005	*	0,001	0,024
F15	0,003	0,001	0,009	*	0,027	0,005
F16	0,009	0,002	0,016	*	0,026	0,005
F19	0,006	0,003	0,016	*	0,017	0,005
F27	0,009	0,005	0,015	*	0,022	0,006
F29	*	0,006	*	0,005	*	0,001
F32	0,014	0,001	0,012	*	0,005	0,008
F33	0,005	0,005	0,012	*	0,002	0,007
F36	0,005	0,001	0,013	*	0,020	0,007
F41	0,006	0,004	0,019	*	0,010	0,004
F43	0,002	0,022	0,028	0,007	0,005	*
F48	*	0,015	0,024	0,006	*	0,002
A	0,002	0,014	0,006	0,005	0,004	0,001

Os polissacarídeos isolados dos filtrados de cultura bacteriana das espécies de *F. columnare* e *A. hydrophila* são todos heteropolissacarídeos, com proporções variadas de açúcares neutros e ácidos urônicos. A ramnose foi detectada em todas as amostras, sendo a glicose encontrada em maior concentração nas cepas de *F. columnare*, dado corroborado por RATTI et al. (2005) para cepas de *Cytophaga* sp (antiga nomenclatura do gênero *Flavobacterium*).

Como já relatado por OTOBONI (2005), um fato essencial no desenvolvimento do trabalho é a necessidade de um crescimento lento na placa de Petri para obtenção de uma maior produção possível de EPS. Sabe-se que os EPSs apresentam a função de proteção da célula bacteriana em condições ambientais estressantes, portanto a sua expressão “in vitro” é favorecida quando o meio é pobre em nutrientes ou a temperatura não é a ótima para o crescimento da espécie em questão.

Entretanto, a baixa quantidade de monossacarídeos extraída deve-se a inúmeros fatores, já relatados por RATTO et al. (2005), como a dificuldade de obtenção de um meio de cultura que expresse a produção de biofilme, e que ao mesmo tempo atenda às exigências para o crescimento da bactéria, fatores abióticos, e as impurezas liberadas pelas células no processo de extração do EPS.

Sabendo-se que os polissacarídeos microbianos são componentes integrais dos biofilmes, e que a matriz do mesmo varia amplamente dependendo das estruturas celulares presentes e das condições predominantes, uma alternativa ao controle das epizootias seria o desenvolvimento de métodos enzimáticos, impedindo a formação do biofilme nos estágios iniciais, e assim a infecção não se instalaria nos peixes em cultivo.

Métodos enzimáticos baseados em proteinases já estão em uso no caso de indústrias produtoras de papel. Assim, estruturas de proteínas estão envolvidas especialmente nos estágios iniciais de desenvolvimento do biofilme e a ligação inicial é geralmente estabilizada por polissacarídeos nos biofilmes maduros (RATTO et al., 2005). Futuramente, métodos enzimáticos semelhantes devem ser desenvolvidos para aplicações na piscicultura, de modo preventivo aos surtos de doenças.

## CONCLUSÃO

De acordo com os resultados observados, a formação de biofilme não está diretamente relacionada à presença de cápsula na célula bacteriana, diferentemente do que se pressupunha até o momento. Além disso, o conhecimento dos monossacarídeos presentes no EPS de *F. columnare* e *A. hydrophila* é um dado relevante para futuros

estudos que busquem métodos enzimáticos para controle e/ou impedimento da aderência e formação de biofilmes destes patógenos aquáticos em sistemas de aqüicultura e conseqüentemente a prevenção de epizootias, que não só representam um problema de sanidade, como também substanciais perdas econômicas na aqüicultura mundial.

## REFERÊNCIAS

BASSON, A., FLEMMING, L.A., CHENIA, H.Y. Evaluation of adherence, hydrophobicity, aggregation, and biofilm development of *Flavobacterium johnsoniae*-like isolates. **Microbial Ecol.**, vol 55, p. 1-14, 2007.

CAMPANHARO, J. C. **Produção e avaliação de exopolissacarídeos sintetizados por rizóbios**. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista , Jaboticabal, SP. 2006.

CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, E. G. M. Composição de exopolissacarídeos produzidos por estirpes de rizóbios cultivados em diferentes fontes de carbono. **Pesq. Agrop. Bras.**, v. 42, n. 10, p. 1503-1506, 2007.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilmes: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, p. 1318-1322, 1999.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, vol 28, p. 350-356, 1956.

FIGUEIREDO, H. S., LEAL, C. A. G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **R. Bras. Zootec.**, v.37, suplemento especial p.08-14, 2008.

FREEMAN, D. J., FALKINER, F. R., KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci, **J. Clin. Pathol.** v. 42, p.872-874, 1989.

MØLLER, J. D., J. L. LARSEN, L. MADSEN, AND I. DALSGAARD. Involvement of a sialic acid-binding lectin with hemagglutination and hydrophobicity of *Flavobacterium psychrophilum*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, p. 5275–5280, 2003.

OLIVARES-FUSTER, O., SHOEMAKER, C.A, KLESIUS, P. H., ARIAS, C. R. Molecular typing of isolates of fish pathogen, *Flavobacterium columnare*, by single-strand conformation polymorphism analysis, **FEMS Microbiol Lett**, v.269, p. 63–69, 2007.

OTOBONI, A.M.M.B. **Determinação da estrutura dos exopolissacarídeos em estirpes de *Xylella fastidiosa* por FTIR e RMN**. 2005, 54 p. Tese (Doutorado em Agronomia, Área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas). Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

PETERS, G., PULVERER, G. Pathogenesis and management of Staphylococcus epidermidis 'plastic' foreign body infections. **J. Antimicrob. Chemother.**, suplemento D, p. 67-71, 1984.

RATTO, M.; SUIHKO, M.-L.; SIIKA-AHO, M. Polysaccharide-producing bacteria isolated from paper machine slime deposits. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, vol. 32, p. 109-114, 2005.

SCHNECK, J, L. E CASLAKE, L. F. Genetic diversity of *Flavobacterium columnare* isolated from fish collected from warm and cold water. **J. Fish Dis.**, vol. 29, p. 245-248, 2006.

WEINER, R., LANGILLE, S.; QUINTERO, E. Structure, function and immunochemistry of bacterial exopolysaccharides. **J. Ind. Microbiol.**,v15, p. 339-346, 1995.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho consistiu em um avanço na pesquisa sobre a *Flavobacterium columnare*, agente causal da columnariose, para a literatura brasileira, e permitiu-se:

- Aprimorar os conhecimentos sobre o isolamento da bactéria, evidenciado pelos 37 novos isolados de *F. columnare* a partir de raspado da lesão da pele e rim cefálico de 02 matrinxãs, 08 tambaquis e 06 tilápias clinicamente diagnosticadas como acometidas de columnariose;
- Corroborar que as características bioquímicas: motilidade, redução do nitrato, produção de flexirrubina, absorção do vermelho congo, fermentação da glicose e sacarose, desaminação do L-triptofano, hidrólise da gelatina e catalase são típicas de *F. columnare*, de acordo com a literatura internacional;
- Caracterizar molecularmente, pela técnica de PCR-RFLP do gene 16S rDNA, a *F. columnare*, sempre comparando com cepas de outras duas importantes bactérias causadoras de doenças na piscicultura, *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae*.
- Comprovar a ampla variabilidade genética presente entre cepas de *F. columnare* isoladas neste trabalho (03 subgrupos genéticos) apesar da uniformidade fenotípica e bioquímica;
- Identificar quais isolados de *F. columnare* apresentam cápsula e quais produzem biofilme, não sendo uma relação diretamente proporcional;
- Caracterizar os monossacarídeos presentes no exopolissacarídeo de *F. columnare* (principalmente glicose e ácido glucurônico) e comparar os resultados com os de *A. hydrophila* (maior concentração de ramnose).

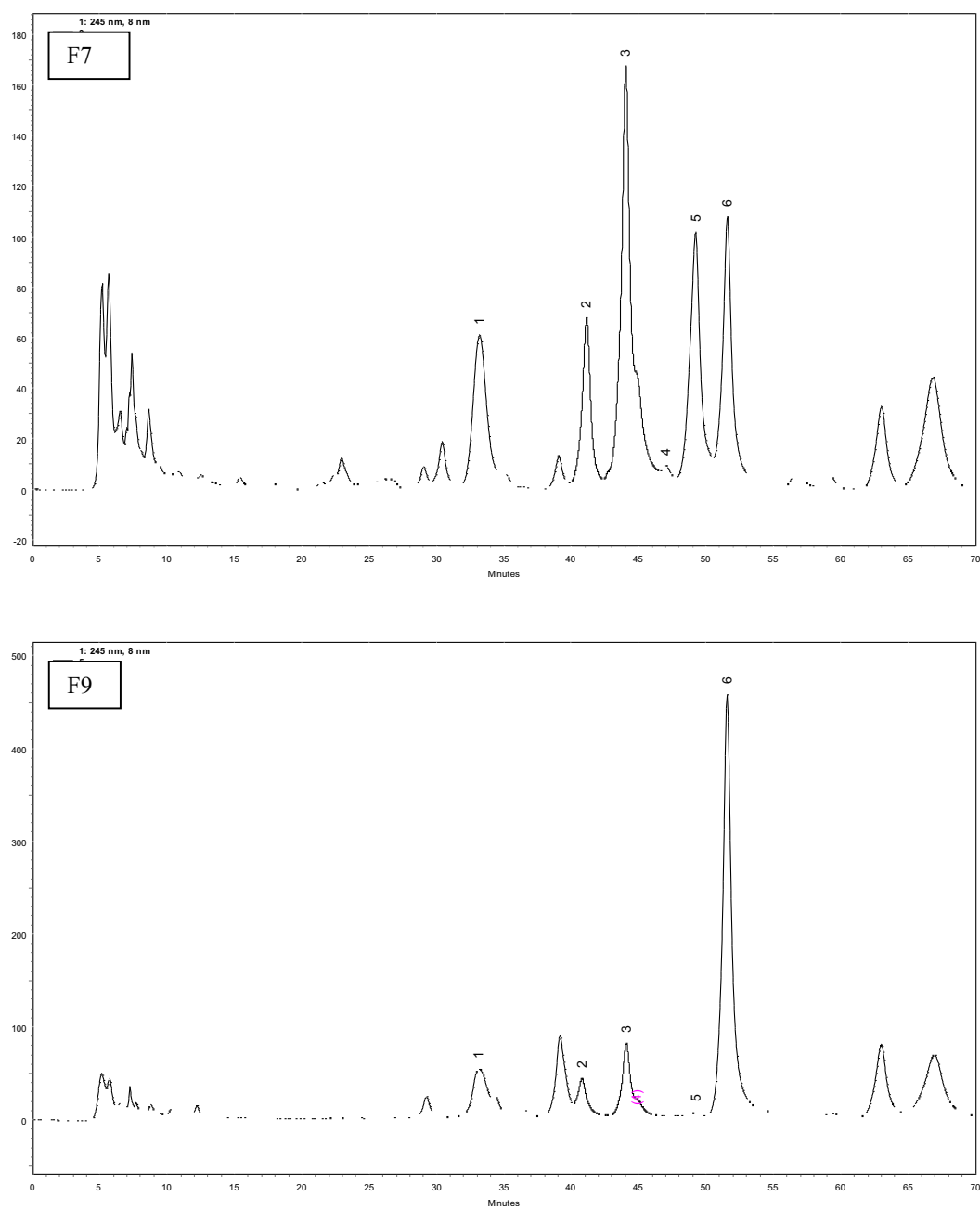
Em relação à importância do capítulo 2, sobre a caracterização molecular, o diagnóstico confirmativo a respeito de columnariose poderá ser deliberado em no

máximo três dias, tornando o processo de tratamento dos peixes, com o medicamento adequado, mais rápido e, evitando substanciais perdas econômicas na piscicultura.

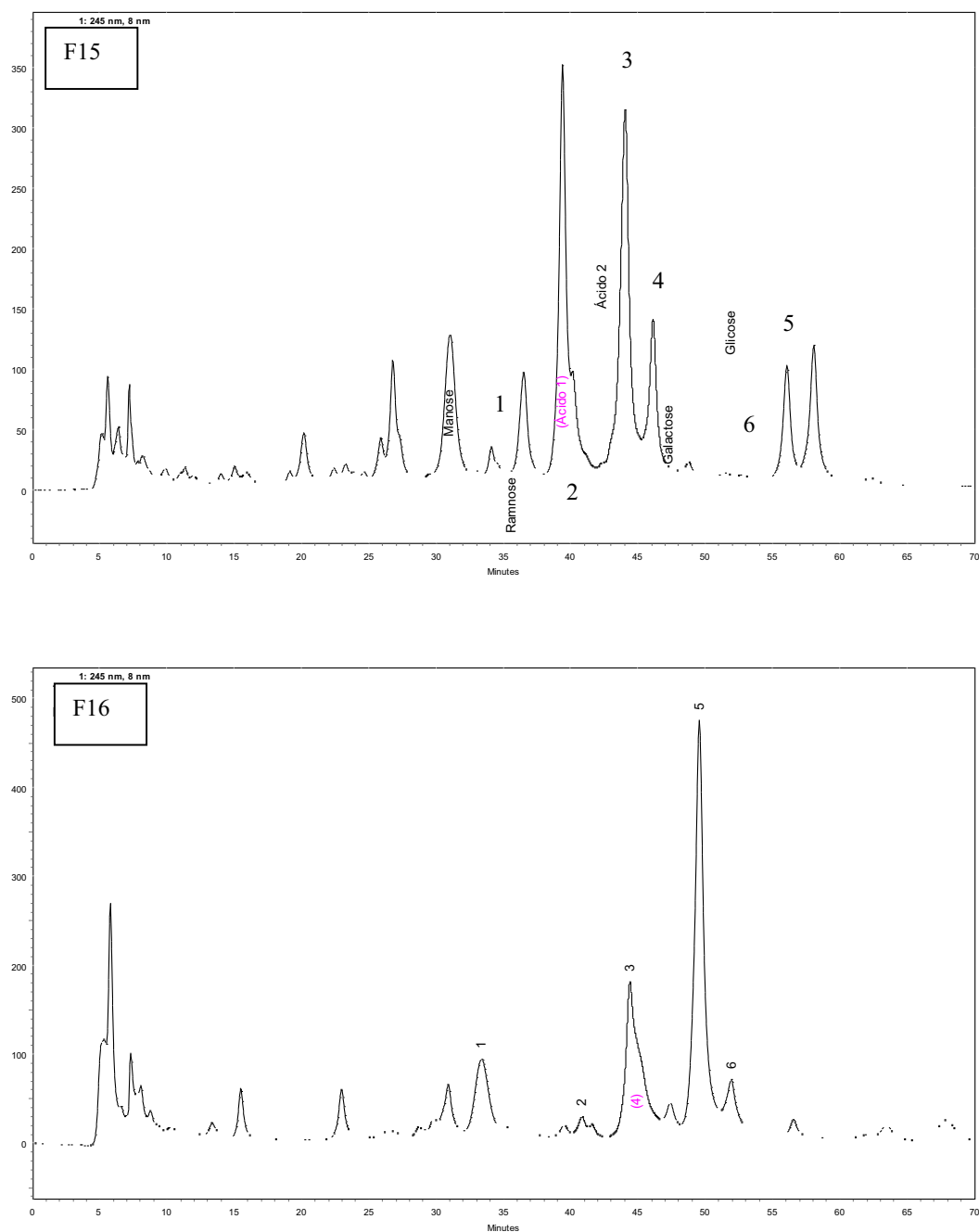
Além disso, o capítulo 3, sobre biofilmes, corrobora o ponto de vista do manejo preventivo, ou seja, a higienização periódica dos sistemas de piscicultura, o controle da qualidade da água e quantidade de ração impedem e/ou dificultam a formação de biofilmes e, como consequência, a instalação ou reincidência de infecções bacterianas.

Para o futuro espera-se a popularização das técnicas moleculares e seu barateamento, a fim de se agilizar e facilitar o diagnóstico de doenças na área da aquicultura brasileira e também o desenvolvimento de métodos enzimáticos para controle ou impedimento da aderência e formação de biofilmes pelos patógenos aquáticos em sistemas de aquicultura e assim, a prevenção de epizootias.

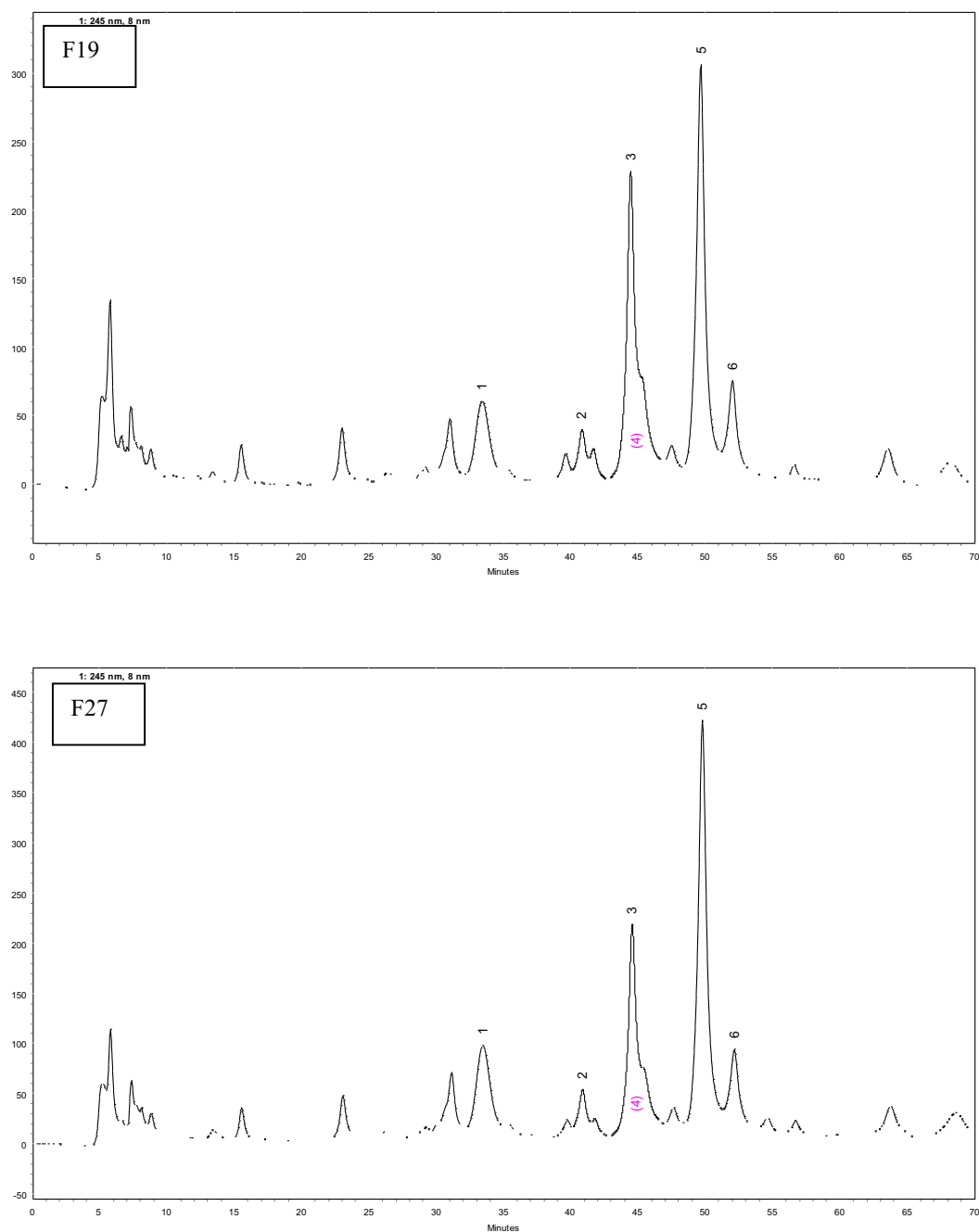
## APÊNDICE



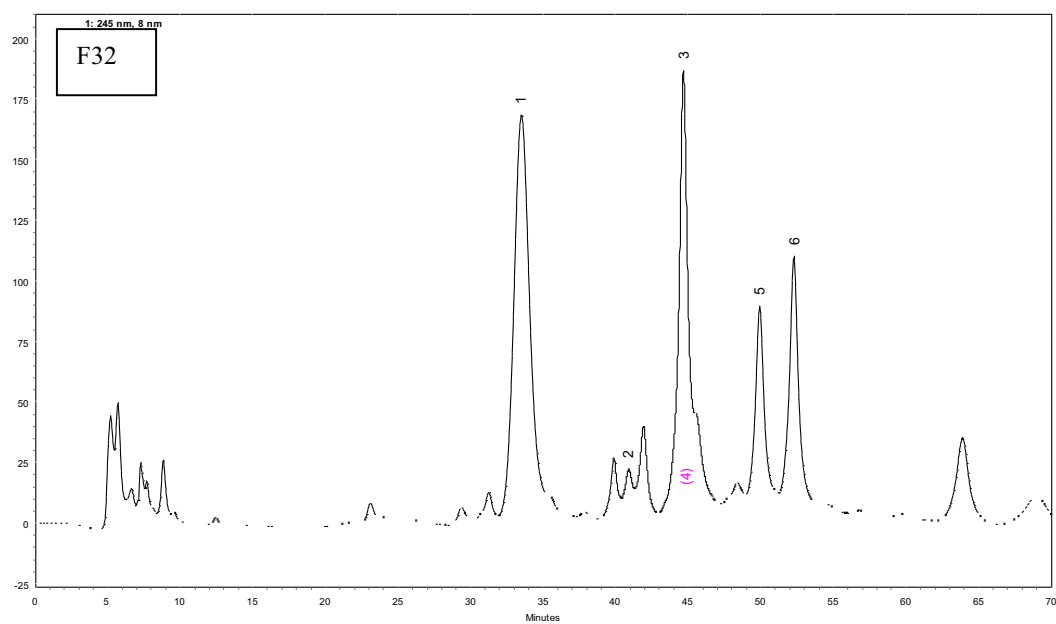
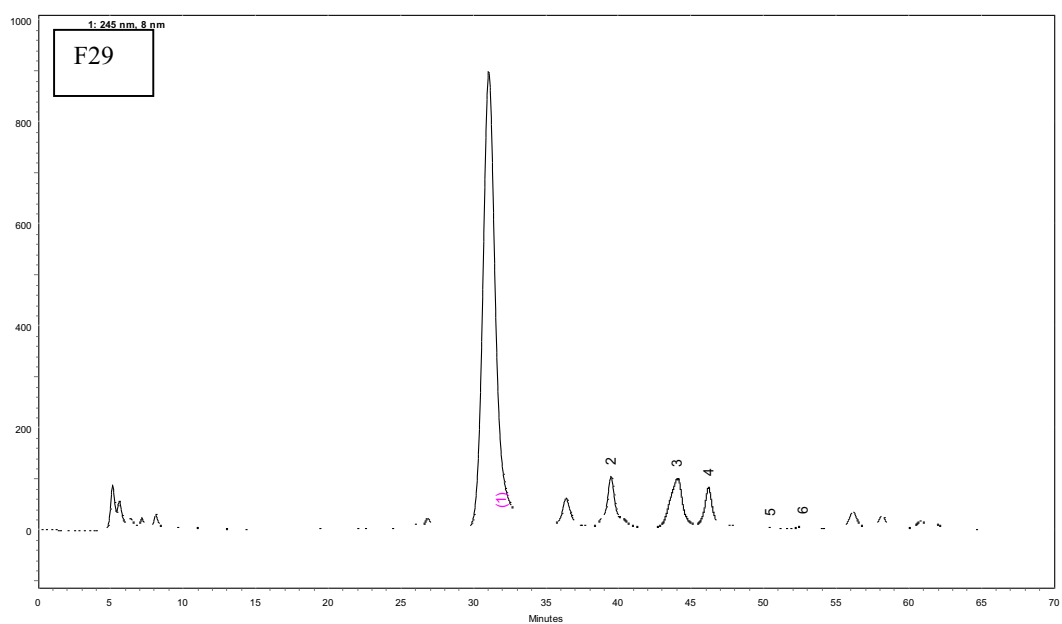
**Figura 1.** Perfis cromatográficos representativos de açúcares pré-derivatizados com PMP obtidos a partir da hidrólise de exopolissacarídeos dos isolados F7 e F9 de *Flavobacterium columnare*. Manose (1); Ramnose (2); Ácido glucurônico (3); Ácido galactorônico (4); Glicose (5); Galactose (6).



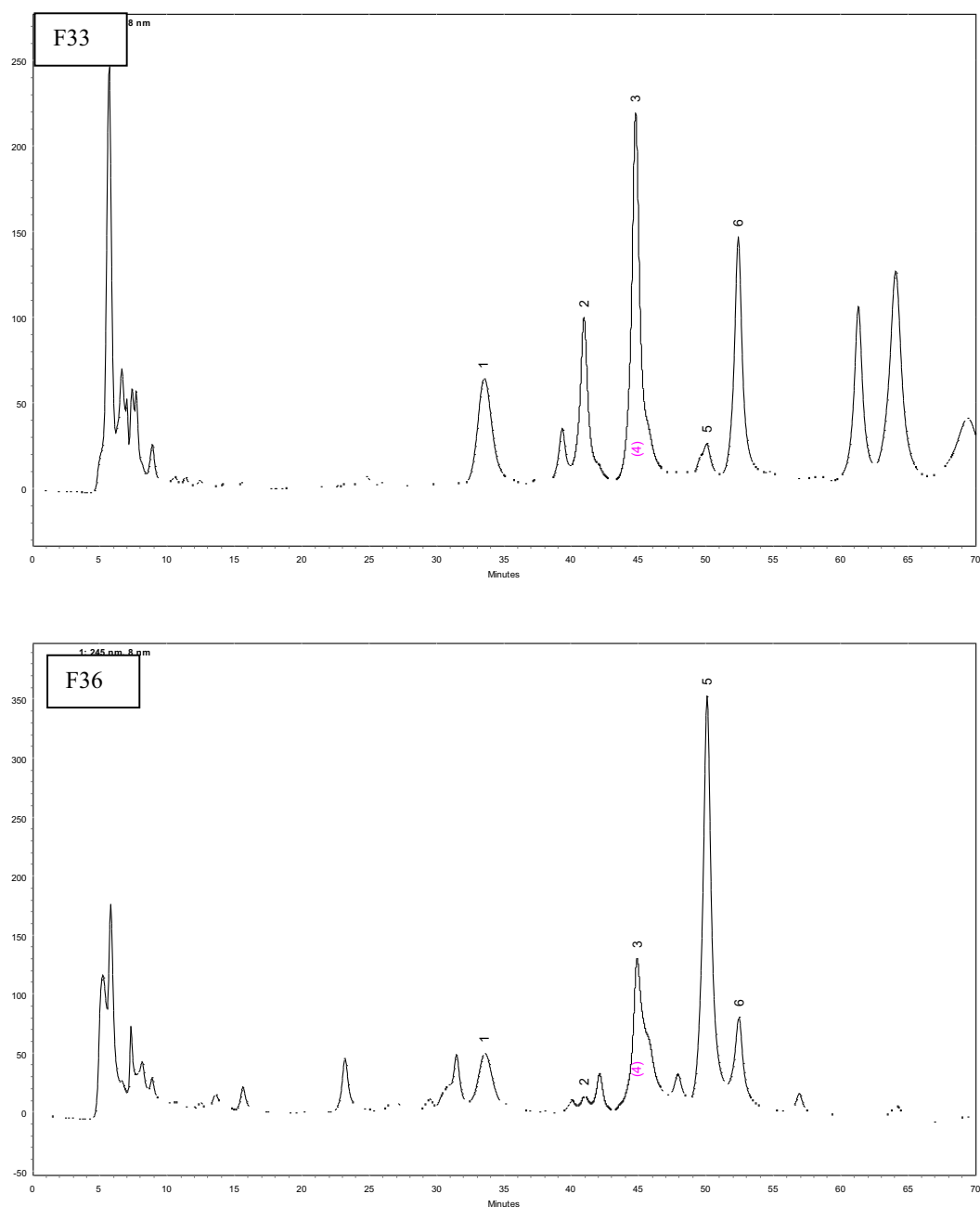
**Figura 2.** Perfis cromatográficos representativos de açúcares pré-derivatizados com PMP obtidos a partir da hidrólise de exopolissacarídeos dos isolados F15 e F16 de *Flavobacterium columnare*. Manose (1); Ramnose (2); Ácido glucurônico (3); Ácido galactorônico (4); Glicose (5); Galactose (6).



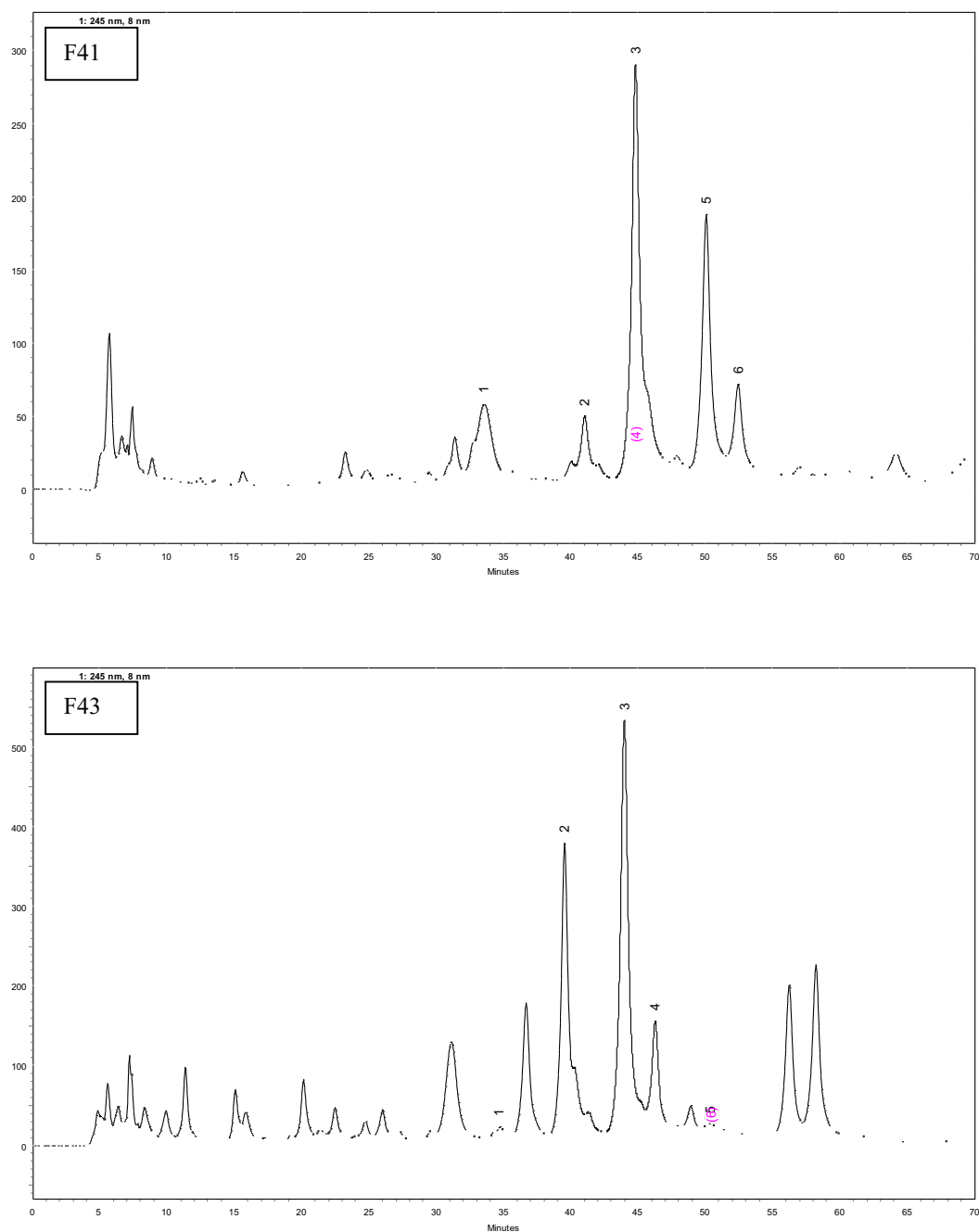
**Figura 3.** Perfis cromatográficos representativos de açúcares pré-derivatizados com PMP obtidos a partir da hidrólise de exopolissacarídeos dos isolados F19 e F27 de *Flavobacterium columnare*. Manose (1); Ramnose (2); Ácido glucurônico (3); Ácido galactorônico (4); Glicose (5); Galactose (6).



**Figura 4.** Perfis cromatográficos representativos de açúcares pré-derivatizados com PMP obtidos a partir da hidrólise de exopolissacarídeos dos isolados F29 e F32 de *Flavobacterium columnare*. Manose (1); Ramnose (2); Ácido glucurônico (3); Ácido galactorônico (4); Glicose (5); Galactose (6).

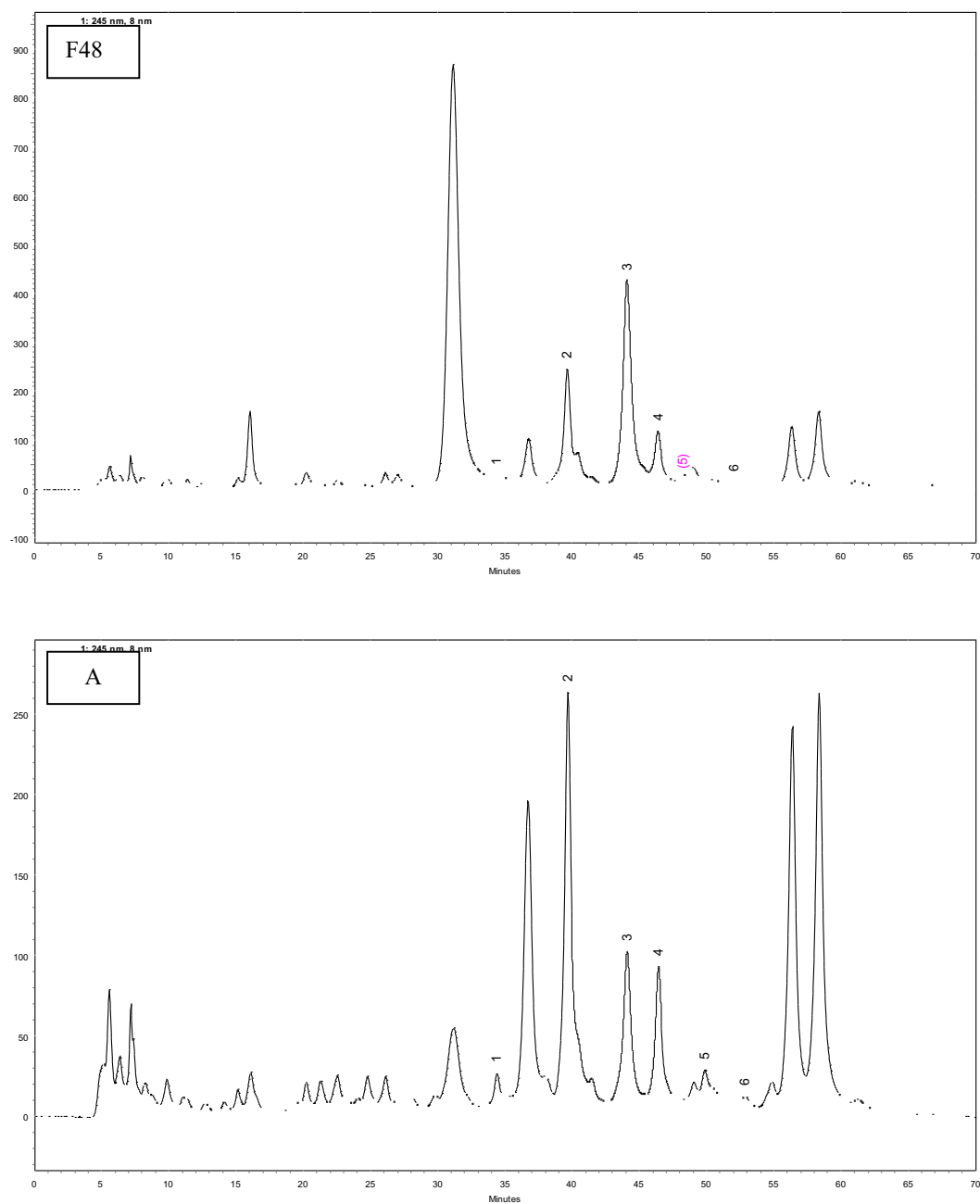


**Figura 5.** Perfis cromatográficos representativos de açúcares pré-derivatizados com PMP obtidos a partir da hidrólise de exopolissacarídeos dos isolados F33 e F36 de *Flavobacterium columnare*. Manose (1); Ramnose (2); Ácido glucurônico (3); Ácido galactorônico (4); Glicose (5); Galactose (6).



**Figura 6.** Perfis cromatográficos representativos de açúcares pré-derivatizados com PMP obtidos a partir da hidrólise de exopolissacarídeos dos isolados F41 e F43 de *Flavobacterium columnare*. Manose (1); Ramnose (2); Ácido glucurônico (3); Ácido galactorônico (4); Glicose (5); Galactose (6).





**Figura 7.** Perfis cromatográficos representativos de açúcares pré-derivatizados com PMP obtidos a partir da hidrólise de exopolissacarídeos dos isolados F48 de *Flavobacterium columnare* e A de *Aeromonas hydrophila*. Manose (1); Ramnose (2); Ácido glucurônico (3); Ácido galacturônico (4); Glicose (5); Galactose (6).