

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor,
o texto completo deste
documento será
disponibilizado somente a
partir de 21/11/2026.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE
A. HYDROPHILA ISOLADAS DE TRUTA ARCO-ÍRIS
(*Oncorhynchus mykiss*) NO BRASIL**

**Amarildo Petim Siragi Ussene
Engenheiro Agropecuário**

**Jaboticabal
2025**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE *A. HYDROPHILA*
ISOLADAS DE TRUTA ARCO-ÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*) NO BRASIL**

Discente: Amarildo Petim Siragi Ussene

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Pilarski

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

**Jaboticabal
2025**

U87c	Ussene, Amarildo Petim Siragi Caracterização fenotípica e molecular de <i>A. hydrophila</i> isoladas de truta arco-íris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) no Brasil / Amarildo Petim Siragi Ussene. -- Jaboticabal, 2025 75 p. : tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientadora: Fabiana Pilarski 1. Trutas arco-íris. 2. <i>A. hydrophila</i>. 3. Resistência antimicrobiana. 4. Temperatura de incubação. I. Título.
------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE *A. HYDROPHILA* ISOLADAS DE TRUTA ARCO-ÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*) NO BRASIL

AUTOR: AMARILDO PETIM SIRAGI USSENE

ORIENTADORA: FABIANA PILARSKI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Microbiologia Agropecuária, pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **FABIANA PILARSKI**
Data: 24/11/2025 10:39:46-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. FABIANA PILARSKI (Participação Virtual)
CAUNESP / UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
 **HENRIQUE CESAR PEREIRA FIGUEIREDO**
Data: 25/11/2025 08:54:22-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

DOCENTE HENRIQUE CÉSAR PEREIRA FIGUEIREDO (Participação Virtual)
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva / Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) - Belo Horizonte/MG

Documento assinado digitalmente
 **MARITA VEDOVELLI CARDOZO**
Data: 24/11/2025 10:13:19-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. MARITA VEDOVELLI CARDOZO (Participação Virtual)
Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal

Jaboticabal, 24 de novembro de 2025.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Amarildo Petim Siragi Ussene, solteiro, nascido na cidade da Beira, província de Sofala – Moçambique em 02 de marco de 1991. Frequentei a escola João XXIII, onde concluí o ensino primário, secundário e pré-universitário em 2010. No ano seguinte, em 2011, iniciei minha graduação em Licenciatura em Engenharia Agropecuária na Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Zambeze, em Tete, no campus da Vila Ulóngue. Durante a graduação, tive a oportunidade de ganhar experiência prática e técnica em diferentes sistemas de produção agropecuária, atuando como assistente estagiário nas disciplinas de sistemas de produção integrado, fisiologia animal e nutrição, que eram requisitos complementares do curso. Após formar em 2016, recebi o convite para continuar como assistente estagiário até 2022. Em 2023, motivado a aprofundar meus conhecimentos, fiz a seleção para o mestrado em microbiologia agropecuária, sob orientação da professora Dra. Fabiana Pilarski. Durante o mestrado, me adaptei à rotina de trabalho em laboratório, com foco na microbiologia.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao ser supremo onipotente, pelo dom da vida e por ser a âncora inquebrável que me sustentou nos mares por vezes turbulentos desta jornada. A força que me impulsionou em cada etapa e a serenidade para enfrentar os desafios mais exigentes são dádivas da Sua infinita misericórdia.

Aos meus amados pais, Haruni e Cidália, e meus irmãos Valter e Dercio a gratidão que sinto por vocês transcende as palavras, vocês são o farol guia todas as minhas decisões. Mesmo quando a distância física se impôs, senti o calor do vosso amor incondicional, a vossa inabalável tranquilidade e a esperança que sempre depositaram em mim, transformando-se motivação diária. Esta conquista é, intrinsecamente, vossa.

À minha orientadora, a Professora Doutora Fabiana Pilarski. Receber a sua orientação foi um dos maiores privilégios desta caminhada. A sua generosidade ao me acolher na sua equipa, a forma como partilha o conhecimento com leveza e a sua paixão contagiante pela ciência foram a bússola que me guiou. Mais do que uma orientadora, foi uma mentora essencial para o meu crescimento, não apenas profissional, mas profundamente pessoal.

Ao amigo Daniel de Abreu Ferreira. O nosso encontro foi um presente da vida, e a nossa amizade um tesouro. O seu sincero agradecimento pelos valiosos ensinamentos, pelas risadas que aliviaram a pressão e pelas palavras de encorajamento que surgiram no momento exato. Saiba que a consideração que lhe dedico é imensa, e que você se tornou um irmão que a jornada académica me ofereceu.

A todos os colegas do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos da Caunesp – LAPOA. O convívio diário, a parceria inestimável e a ajuda essencial em cada etapa prática foram essenciais para esta experiência. As conversas descontraídas e o espírito de equipa transformaram o laboratório num segundo lar. Foi uma alegria genuína partilhar este percurso com cada um de vocês.

Ao Dr. Arno Juliano Butzge, pela sua dedicação e os ensinamentos práticos nas análises moleculares foram cruciais para a concretização desta pesquisa. A partilha

do seu conhecimento técnico e a paciência em guiar-me nos procedimentos laboratoriais representaram um valor inestimável para a minha formação.

Um agradecimento especial aos funcionários da Caunesp em especial ao Valdecir, Perereca pelos momentos de descontração e risadas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172

Sumário

LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
RESUMO	iii
ABSTRAT	iv
CAPÍTULO 1 - Considerações gerais	1
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Doenças bacterianas em truticulturas	3
2.2 Gênero <i>Aeromonas</i>	4
2.3 Outros patógenos relevantes	5
2.4 Métodos de identificação de patógenos bacterianos em peixes ...	6
2.5 Identificação fenotípica	7
2.6 Identificação por espectrometria de massas	8
2.7 Identificação por métodos moleculares	11
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
RESUMO	24
1 Introdução	25
2 Materiais e Métodos	27
2.1 Isolamento, caracterização e identificação bacteriana	27
2.2 Avaliação da curva de crescimento	27
2.3 Teste de resistência da bactéria aos antimicrobianos	28
2.4 Características enzimáticas de cepas de <i>A. hydrophila</i>	28
2.5 Extração de DNA	29
2.6 Análise filogenética	30
3 Resultados	31
3.1 Curva de crescimento	31
3.2 Taxa de crescimento instantânea	32
3.3 Distribuição dos valores de densidade óptica	33
3.4 Análise de cluster hierárquico de crescimento	33
3.5 Parâmetros de crescimento	34
3.6 Teste de suscetibilidade bacteriana aos antimicrobianos	35
3.7 Características enzimáticas de cepas de <i>A. hydrophila</i>	37
3.8 Análise filogenética	38

173	4 Discussão	40
174	5 Conclusão	53
175	6 Agradecimentos	53
176	7 Referências bibliográficas	54
177		
178		
179		
180		
181		
182		
183		
184		
185		
186		
187		
188		
189		
190		
191		
192		
193		
194		
195		
196		
197		
198		
199		
200		
201		
202		
203		
204		
205		
206		
207		
208		
209		
210		
211		
212		
213		
214		
215		
216		
217		
218		

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1. Primers (P) e condições de amplificação por PCR dos genes 16S</i>	
<i>rRNA, gyrB e rpoB de A. hydrophila.</i>	<i>29</i>
<i>Tabela 2. Primers (P) e condições de amplificação por PCR dos 12 genes de</i>	
<i>virulência de A. hydrophila.</i>	<i>30</i>
<i>Tabela 3. Fenótipos de resistência das cepas de A. hydrophila aos</i>	
<i>antimicrobianos em diferentes temperaturas classificados em conformidade com os</i>	
<i>critérios estabelecidos pelo manual de CLSI 2020.</i>	<i>35</i>
<i>Tabela 4. Distribuição de genes de virulência de isolados de três cepas A.</i>	
<i>hydrophila de truta arco-íris.</i>	<i>40</i>

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. Taxa de crescimento instantânea das cepas de <i>A. hydrophila</i> (4952-2, 5081-4 e 5085-3). (A) Taxa de crescimento instantânea com bactérias incubadas a 15 °C. (B) Taxa de crescimento instantânea com bactérias incubadas a 28 °C. (C) Taxa de crescimento instantânea com bactérias incubadas a 35 °C.	32
Figura 2. Distribuição dos valores de OD das cepas de <i>A. hydrophila</i> (4952-2, 5081-4 e 5085-3). (A) Distribuição dos valores de OD de bactérias incubadas a 15 °C. (B) Distribuição dos valores de OD de bactérias incubadas a 28 °C. (C) Distribuição dos valores de OD de bactérias incubadas a 35 °C.	33
Figure 3. Análise de Cluster Hierárquico de Crescimento das cepas de <i>A. hydrophila</i> (4952-2, 5081-4 e 5085-3). (A) Análise de Cluster Hierárquico de Crescimento a 15 °C. (B) Análise de Cluster Hierárquico de Crescimento a 28 °C. (C) Análise de Cluster Hierárquico de Crescimento a 35 °C.	34
Figura 4. Parâmetros de crescimento das cepas de <i>A. hydrophila</i> (4952-2, 5081-4 e 5085-3). (A) Parâmetros de crescimento das cepas a 15 °C. (B) Parâmetros de crescimento das cepas a 28 °C. (C) Parâmetros de crescimento das cepas a 35 °C.	35
Figure 5. Halos das atividades enzimáticas das cepas de <i>A. hydrophila</i> (4952-2, 501-4 e 5085-3) incubadas sob diferentes temperaturas. A, B e C – proteólise das cepas (4952-2, 501-4 e 5085-3) a 15 °C; D, E e F – hemólise das cepas (4952-2, 501-4 e 5085-3) a 15 °C; G, H e I - proteólise das cepas (4952-2, 501-4 e 5085-3) a 28 °C; J, K e L - hemólise das cepas (4952-2, 501-4 e 5085-3) a 28 °C; M, N e O - proteólise das cepas (4952-2, 501-4 e 5085-3) a 35 °C; P, Q e R - hemólise das cepas (4952-2, 501-4 e 5085-3) a 35 °C.	37
Figure 6. Árvore filogenética das sequências do gene concatenados 16S rRNA, gyrB e rpoB de <i>A. hydrophila</i> das cepas 4952-2, 5081-4 e 5085-3.	39

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE *A. HYDROPHILA* ISOLADAS DE TRUTA ARCO-ÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*) NO BRASIL

RESUMO- A aquicultura tem-se afirmado como um dos setores de produção alimentar de maior crescimento global, impulsionada pela necessidade de alimentar uma população, e este setor é reconhecido como uma alternativa estratégica para a segurança alimentar. A truta arco-íris em particular vem se destacando com uma das espécies de produção importantes na aquicultura, devido a sua adaptabilidade, rápido crescimento e qualidade da carne impulsionaram a sua disseminação global. Contudo, a intensificação da aquicultura traz desafios sanitários significativos, com a proliferação de doenças a representar uma ameaça constante. A identificação precisa dos agentes etiológicos é crucial, e aqui também se observam avanços metodológicos. Embora não haja um consenso sobre uma abordagem padrão-ouro, a utilização de métodos de identificação genômica é cada vez mais valorizada pela sua alta resolução e especificidade. A caracterização molecular de isolados bacterianos, incluindo o sequenciamento do genoma completo, tem sido fundamental para compreender a epidemiologia de doenças. Este tipo de análise permite entender a relação filogenética entre estirpes de diferentes regiões. A acurácia no diagnóstico de enfermidades bacterianas é o alicerce para estratégias de controlo eficazes, incluindo a seleção de tratamentos adequados, medidas de biossegurança e o desenvolvimento de medidas profiláticas mais efetivas. Estes avanços são vitais para garantir a sustentabilidade e o crescimento contínuo do setor aquícola global.

Desta forma, este estudo teve como objetivo caracterizar fenotipicamente e molecularmente cepas de *A. hydrophila* (n=3) oriundas de truticulturas de duas regiões do Brasil. A avaliação do crescimento mostrou-se influenciado pela temperatura. A resistência antimicrobiana foi realizada frente a nove antimicrobianos em duas temperaturas (15 °C e 28 °C), na temperatura mais alta, as cepas foram mais resistentes aos antimicrobianos (Ampicilina, Amoxicilina, Cefazolina, Florfenicol e Oxitetraciclina), sugerindo efeito termoinduzido. Para avaliação filogenética, o gDNA foi extraído para amplificação dos genes 16S rRNA, gyrB e rpoB utilizando primers descritos na literatura. A filogenia com as sequencias homologas dos genes gyrB e rpoB foram concatenadas. A árvore consenso foi obtida a partir de 250.000 gerações, utilizando o software Mr. Bayes 2.0. Os resultados da análise filogenética confirmam de que as cepas do estudo pertencem a *A. hydrophila*, agrupando cepas em estudo e outras cepas de *A. hydrophila* de diversas origens geográficas no mesmo clado, indicando ancestralidade comum entre as cepas.

Palavras chaves: *Oncorhynchus mykiss*; *A. hydrophila*; resistência antimicrobiana

PHENOTYPIC AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *A. HYDROPHILA* ISOLATED FROM RAINBOW TROUT (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) IN BRAZIL

ABSTRACT - Aquaculture has emerged as one of the fastest-growing food production sectors worldwide, driven by the need to feed a growing population. This sector is increasingly recognized as a strategic alternative for ensuring food security. Rainbow trout has become one of the most important aquaculture species due to its adaptability, rapid growth, and high flesh quality, which have promoted its global dissemination. However, the intensification of aquaculture practices poses significant health challenges, with the proliferation of diseases representing a constant threat. Accurate identification of etiological agents is crucial, and methodological advances have been observed in this area as well. Although no universally accepted gold-standard approach exists, genomic identification methods are increasingly valued for their high resolution and specificity. Molecular characterization of bacterial isolates, including whole-genome sequencing, has been fundamental to understanding the epidemiology of diseases. This type of analysis enables the elucidation of phylogenetic relationships among strains from different geographic regions. Accurate diagnosis of bacterial diseases is the cornerstone of effective control strategies, including the selection of appropriate treatments, the implementation of biosecurity measures, and the development of more effective prophylactic measures. These advances are essential to ensure the sustainability and continued growth of the global aquaculture industry. In this context, the present study aimed to phenotypically and molecularly characterize *A. hydrophila* strains (n = 3) isolated from trout farms located in two regions of Brazil. Growth assessments revealed temperature-dependent variations. Antimicrobial resistance was evaluated against nine antimicrobials at two temperatures (15 °C and 28 °C). At the higher temperature, the strains exhibited increased resistance to antimicrobials (Ampicillin, Amoxicillin, Cefazolin, Florfenicol, and Oxytetracycline), suggesting a thermo-induced effect. For phylogenetic analyses, genomic DNA was extracted and the 16S rRNA, *gyrB*, and *rpoB* genes were amplified using primers described in the literature. Homologous sequences of *gyrB* and *rpoB* genes were concatenated for phylogenetic reconstruction. A consensus tree was generated from 250,000 generations using Mr. Bayes 2.0. The phylogenetic analysis confirmed that the strains belong to *A. hydrophila*, clustering together with other *A. hydrophila* strains from different geographic origins within the same clade, indicating a common ancestry among the isolates.

Keywords: *Oncorhynchus mykiss*, *A. hydrophila*, antimicrobial resistance

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura consolidou-se como um dos setores de produção de alimentos com maior crescimento nas últimas décadas, impulsionada por uma população global em expansão e pelo declínio dos estoques pesqueiros de captura. Neste cenário, a atividade aquícola emerge como uma alternativa estratégica para suprir a crescente demanda por pescado e fortalecer a segurança alimentar (FAO, 2022). O avanço do setor é sustentado por inovações tecnológicas, melhoramento genético das espécies produzidas e pela diversificação dos sistemas de produção. Contudo, a intensificação e a expansão da aquicultura enfrentam desafios sanitários significativos. A elevada densidade populacional, o manejo intensivo e as condições ambientais adversas, potencializadas pelas mudanças climáticas, criam um ambiente propício à proliferação de doenças, que representam uma ameaça constante à sustentabilidade da indústria (FAO, 2024).

A truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), nativa da costa oeste da América do Norte, é uma das espécies de peixes de água doce mais estudadas e produzidas em todo o mundo. Sua produção comercial remonta ao final do século XIX, com os primeiros esforços de propagação artificial nos Estados Unidos (Stanković et al., 2015). A notável adaptabilidade da espécie a diferentes condições climáticas, seu rápido crescimento, a qualidade de sua carne e sua popularidade na pesca esportiva foram fatores determinantes para sua disseminação global (D'Agaro et al., 2022). A partir do início do século XX, ovos de truta arco-íris foram exportados para a Europa, Ásia, América do Sul, África e Oceania, estabelecendo as bases para a truticultura em mais de 80 países. Atualmente, a produção global ultrapassa 850 mil toneladas anuais, com destaque para grandes produtores como Chile, Noruega, Irã, Turquia e a União Europeia, refletindo a importância econômica da espécie (D'Agaro et al., 2022; FAO, 2024). A indústria moderna da truticultura é caracterizada pela alta tecnologia empregada, que abrange desde sistemas de recirculação de água (RAS) até programas de melhoramento genético que visam a seleção de linhagens mais resistentes a doenças e com melhor conversão alimentar (D'Agaro et al., 2022).

No Brasil, a introdução da truta arco-íris ocorreu em 1949, com a importação de ovos embrionados da Dinamarca, visando o povoamento de rios em regiões serranas. A atividade comercial consolidou-se a partir da década de 1970, com o desenvolvimento de técnicas de reprodução artificial e a instalação das primeiras truticulturas comerciais (De Carvalho, 2008; Moreira and Silva, 2023).

Atualmente, a produção brasileira está concentrada nas regiões montanhosas dos estados do Sudeste e Sul, que oferecem condições ideais de temperatura e qualidade da água. Minas Gerais lidera a produção nacional, seguido por Santa Catarina, São Paulo e Rio de Janeiro (De Carvalho, 2008; Júnior et al., 2023).

Os dados mais recentes do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) indicam uma produção nacional que oscila entre 2.000 e 3.000 toneladas anuais. A truticultura no país é caracterizada por uma diversidade de sistemas de produção, desde pequenas propriedades de agricultura familiar até grandes indústrias de processamento. Essa diversidade, embora economicamente vantajosa, cria múltiplos cenários para a emergência de surtos de doenças bacterianas. A identificação precisa dos agentes etiológicos em salmonídeos de água doce permanece um desafio, mesmo com os avanços nas técnicas de diagnóstico. Diversos estudos correlacionam o rápido desenvolvimento da aquicultura com a disseminação de patógenos emergentes, um fenômeno associado a uma complexa interação de fatores ambientais, ligados ao hospedeiro e à qualidade da água (Ahmed et al., 2025).

Neste contexto, a identificação precisa das propriedades fenotípicas e moleculares das bactérias envolvidas em surtos é fundamental para a compreensão da epidemiologia das doenças. Assim, este estudo teve como objetivo caracterizar fenotípica e molecularmente cepas de *A. hydrophila* isoladas de trutas arco-íris com sinais clínicos de infecção, provenientes de truticulturas de regiões produtoras do Brasil.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doenças bacterianas em truticulturas

A intensificação da produção de trutas arco-íris, embora essencial para atender à demanda do mercado, o efeito das mudanças ambientais cria um ambiente propício à ocorrência de doenças, cujo diagnóstico etiológico preciso representa um dos maiores desafios para a sustentabilidade da atividade (Duman et al., 2025; Liu et al., 2025a). As altas densidades populacionais e o manejo constante geram estresse crônico nos animais, tornando-os mais suscetíveis a infecções por patógenos oportunistas. As doenças bacterianas, em particular, são responsáveis por perdas econômicas significativas na truticultura mundial e brasileira, resultando em altas taxas de mortalidade, redução do crescimento e aumento dos custos com tratamentos (Liu et al., 2025a; Wang et al., 2021).

As bactérias patogênicas para a truta arco-íris são caracterizadas por uma notável diversidade de agentes etiológicos. O espectro de patógenos inclui bactérias Gram-negativas, como os gêneros *Chryseobacterium*, *Citrobacter*, *Deefgea*, *Flavobacterium*, *Janthinobacterium*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas*, *Shewanella* e *Aeromonas*, e Gram-positivas, como *Lactococcus* e *Weissella*. Em conjunto, um total de 36 espécies patogênicas emergentes já foram identificadas mundialmente, evidenciando a amplitude do desafio sanitário para a truticultura (Duman et al., 2025). O surto de doenças bacterianas na produção de truta arco-íris são fenômenos multifatoriais, intrinsecamente associados a um conjunto de fatores de risco. Entre estes, destacam-se as condições ambientais adversas, as elevadas densidades de estocagem e as flutuações sazonais na qualidade da água. Adicionalmente, falhas no diagnóstico preciso dos agentes etiológicos durante surtos infecciosos conduzem frequentemente à implementação de terapias inadequadas, um fator que exacerba o desenvolvimento e a disseminação da resistência antimicrobiana no ambiente aquicultura.

2.2 Gênero *Aeromonas*

Aeromonas é uma bactéria Gram-negativa, móvel, pertencente à família Aeromonadaceae, amplamente distribuída em ambientes de água doce (Cao et al., 2020a; Liu et al., 2025b). É considerada um patógeno oportunista, capaz de causar a doença conhecida como Septicemia Hemorrágica, uma das enfermidades mais comuns e devastadoras na piscicultura (Rostang et al., 2025). A infecção geralmente ocorre em peixes submetidos a estresse, como manejo inadequado, má qualidade da água ou flutuações de temperatura da água (Liu et al., 2025b). A patogenicidade do gênero *Aeromonas* é um processo multifatorial, mediado pela expressão de um amplo arsenal de fatores de virulência que atuam de forma sinérgica para causar danos aos tecidos do hospedeiro.

Estes fatores podem ser categorizados com base em sua função, incluindo: toxinas e hemolisinas: Proteínas como a aerolisina (aer), enterotoxinas citotóxicas (act, alt, ast) e hemolisinas (hly), que são responsáveis por induzir citotoxicidade e lise celular; enzimas extracelulares: enzimas hidrolíticas, como lipases (lip), serina proteases (ser), elastases (ahyB), colesterol aciltransferase (gcaT), nucleases (nuc) e DNases (exu), que degradam componentes da matriz extracelular e tecidos do hospedeiro, facilitando a invasão bacteriana; fatores de adesão e motilidade, substância de agregação (asa) e os sistemas flagelares (polar, fla; lateral, lafA), que são cruciais para a colonização de superfícies e a motilidade no ambiente do hospedeiro, sistemas de secreção do tipo III (T3SS), composto por proteínas AscV, AexT4 e AopP, aparato molecular para injetar proteínas efetoras diretamente no citoplasma das células do hospedeiro, modulando a resposta imune e promovendo a sobrevivência bacteriana (Qian et al., 2021; Liu et al., 2025a). A expressão dos genes de virulência e secreção de enzimas extracelulares, estão relacionados a características de crescimento das cepas de *Aeromonas*.

2.3 Outros patógenos relevantes

Adicionalmente, um conjunto diversificado de outros agentes bacterianos representa ameaças significativas para a truticultura. A furunculose, uma enfermidade clássica em salmonídeos causada por *Aeromonas salmonicida*, é caracterizada pelo desenvolvimento de lesões ulcerativas profundas, conhecidas como furúnculos. A columnariose, cujo agente etiológico é *Flavobacterium columnare*, acomete primariamente as brânquias e a superfície corporal dos peixes, resultando em lesões necróticas que frequentemente culminam em insuficiência respiratória. Patógenos como *Edwardsiella tarda*, *Lactococcus garvieae* e diversas espécies do gênero *Streptococcus* também têm sido consistentemente associados a surtos de mortalidade em trutas, o que evidencia a complexidade do panorama sanitário que desafia a sustentabilidade da aquicultura moderna (Cao et al., 2020b; Duman et al., 2025; Liu et al., 2025b; Qian et al., 2021).

Outra importante bactéria é a *Weissella*, uma bactéria Gram-positiva, cocobacilar, pertencente à família *Leuconostocaceae*. Encontradas em diferentes habitats, como fezes e saliva de animais saudáveis. Neste gênero maioria das espécies são consideradas não patogênicas, com exceção da *Weissella trutae* (Thi Ninh et al., 2025) e *Weissella ceti* (Liu et al., 2009; Mitomi et al., 2018; Figueiredo et al., 2015), (Pereira et al., 2022).

Weissella ceti, originalmente identificada em cetáceos, emergiu como um importante patógeno na truticultura, sendo o agente etiológico da Weisselose. Em trutas arco-íris, a infecção manifesta-se como um quadro de septicemia hemorrágica aguda, com alta mortalidade, letargia, exoftalmia, além de hemorragias internas e externas. A ocorrência de surtos de Weisselose em truticulturas tem sido documentada em escala global, com registros na China (Liu et al., 2009), Brasil (Figueiredo et al., 2012), Estados Unidos (Welch and Good, 2013), Japão (Mitomi et al., 2018), Peru (Medina et al., 2020) e o mais recente no Vietnã (Thi Ninh et al., 2025).

O surto mais recente de weisselose no Brasil provocou perdas significativas com mortalidade de 50% a 80% durante os meses mais quentes do ano. Também já foram relatados surto na época das chuvas com mortalidades de até 60% em truticultura de gaiolas flutuantes no lago Titicaca no Peru. Os sinais clínicos

apresentados pelos animais doentes eram exoftalmia uni ou bilateral, melanose e heorragia oculares (Mitomi et al., 2018; Medina et al., 2020; Thi Ninh et al., 2025). A necropsia realizada revelou hemorragia gravea baxiga natatoria, cerebro, figado e musculo e congestao intestinal. Este sinais clinicos foram confirmados mediante desafios experimentais confirmando *weissella cite* como agente patogenico de trutas arco-iris (Thi Ninh et al., 2025).

A caracterização molecular de isolados brasileiros, incluindo o sequenciamento do genoma completo, tem sido fundamental para entender a epidemiologia da doença e a relação filogenética das cepas brasileiras com as de outras partes do mundo, como China e Estados Unidos, onde a Weisselose também causa perdas econômicas importantes (Figueiredo et al., 2015).

2.4 Métodos de identificação de patógenos bacterianos em peixes

A identificação de patógenos em peixes dispõe atualmente de diferentes modelos metodológico. Contudo, não existe um consenso unânime na comunidade científica sobre uma abordagem padrão-ouro.(Piamsomboon et al., 2020). Muitos pesquisadores utilizam métodos de identificação genômica, considerando-os a metodologia de eleição devido à sua alta resolução e especificidade. Em contrapartida, microbiologistas mais tradicionais sustentam que os métodos fenotípicos convencionais, baseados na análise da morfologia colonial, padrões de crescimento e perfis bioquímicos, oferecem uma caracterização mais fidedigna e precisa do isolado (Assis et al., 2017; Ferone et al., 2020).

Apesar dos avanços significativos nas metodologias de identificação bacteriana, a acurácia dos métodos disponíveis permanece um tema de debate. Cada abordagem apresenta um balanço distinto de vantagens e desvantagens, o que inviabiliza a eleição de um único método como padrão universal. Adicionalmente, a precisão do diagnóstico etiológico é influenciada por uma série de variáveis operacionais e técnicas, que incluem a qualidade dos equipamentos e reagentes, a padronização dos meios de cultura e testes fenotípicos, a performance dos kits moleculares e, de forma crucial, a expertise da equipe de laboratório (Assis et al., 2017; Piamsomboon et al., 2020).

A acurácia no diagnóstico de enfermidades bacterianas constitui o alicerce para a implementação de estratégias de controle eficazes (Assis et al., 2017). A identificação precisa do agente etiológico é um pré-requisito para a seleção de protocolos terapêuticos adequados, para a implementação de medidas de biossegurança direcionadas e para o desenvolvimento de imunoprofiláticos, como as vacinas. O processo de caracterização bacteriana abrange várias metodologias, as quais são classificadas em duas categorias principais: fenotípicas e moleculares (Duman et al., 2022).

2.5 Identificação fenotípica

O pré-requisito fundamental para a caracterização fenotípica é a obtenção de uma cultura bacteriana pura (axênica). Contudo, uma limitação inerente a estes métodos reside na sua resolução taxonômica. Frequentemente, a identificação é confiável apenas ao nível de gênero, sendo a capacidade de discriminação em nível de espécie consideravelmente reduzida (Duman et al., 2022). Dessa forma, a identificação bacteriana é conduzida por um processo de avaliação da similaridade fenotípica. Esta abordagem permite, inicialmente, a atribuição do isolado a um determinado gênero, enquanto a confirmação em nível de espécie demanda a realização de ensaios complementares mais específicos (Ferone et al., 2020).

Contudo, este modelo de identificação por similaridade fenotípica apresenta uma limitação fundamental: a sua eficácia é intrinsecamente dependente da existência de perfis de referência bem estabelecidos. Essa desvantagem torna-se ainda mais evidenciada quando se deseja identificar organismos pertencentes a gêneros ou espécies que ainda não foram formalmente descritos ou que são fenotipicamente atípicos, representando um desafio significativo para a caracterização de novos táxons (Ferone et al., 2020; Riesco and Trujillo, 2024).

Um dos desafios primordiais no diagnóstico de doenças bacterianas em peixes reside na dificuldade intrínseca ao isolamento dos agentes etiológicos. Diferentemente de mamíferos e outros animais terrestres, os peixes são organismos pecilotérmicos que habitam um ambiente aquático com condições físico-químicas altamente variáveis (Duman et al., 2022).

A vasta diversidade de patógenos bacterianos que acometem peixes implica ampla exigências nutricionais dos meios de cultivo. Fatores como a temperatura e o período de incubação, concentração dióxido de carbono e a composição do meio de cultura variam substancialmente entre as diferentes espécies bacterianas, complicando significativamente o processo de isolamento. Consequentemente, a grande variedade de patógenos e suas naturezas muitas vezes fastidiosas demandam uma abordagem diagnóstica personalizada para cada caso(Duman et al., 2025, 2022; Riesco and Trujillo, 2024).

2.6 Identificação por espectrometria de massas

O genoma bacteriano, uma estrutura de notável complexidade, compreende um conjunto genético que pode variar de 600 a 7.000 genes preditos. Este conjunto de genes codifica a totalidade do potencial proteico de um microrganismo, o proteoma. A análise genômica, portanto, oferece um mapa preditivo do proteoma, permitindo inferir as capacidades funcionais e metabólicas da bactéria (Duman et al., 2022).

Os avanços nas ciências ômicas, com particular ênfase na proteômica, associados à automação e às suas aplicações em tipagem de cepas e epidemiologia, impulsionaram a adoção da espectrometria de massa de tempo de voo com dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) como uma ferramenta robusta para a identificação de microrganismos em diversas áreas do conhecimento (Schumann and Maier, 2014; Singhal et al., 2015).

A identificação bacteriana por MALDI-TOF MS fundamenta-se na análise do perfil proteico do microrganismo. O método gera um espectro de massas peptídicas, que funciona como uma assinatura espectral única para cada microrganismo. A identificação é então realizada por meio da comparação deste espectro com um banco de dados de referência, que contém os perfis proteicos de organismos previamente caracterizados, ou através da comparação direta entre os proteomas dos organismos em estudo (Angeletti, 2017; Singhal et al., 2015).

Apesar de sua crescente aplicação, a fidedignidade dos resultados obtidos por MALDI-TOF MS pode ser questionada, principalmente devido à influência das condições de cultivo no perfil proteico bacteriano. A expressão de proteínas é um

processo dinâmico e adaptativo, diretamente influenciado pela composição do meio de cultura e por outros parâmetros fisiológicos. Consequentemente, variações nas condições de crescimento podem modular o proteoma bacteriano, gerando espectros de massa inconsistentes que, por sua vez, afetam negativamente a acurácia da identificação (Schumann and Maier, 2014; Angeletti, 2017; Duman et al., 2022).

A otimização da preparação de amostras é uma etapa crítica para o sucesso da identificação bacteriana por MALDI-TOF MS. Dois fatores primordiais devem ser considerados: a matriz de origem do isolado e, fundamentalmente, a arquitetura da parede celular bacteriana. A distinção entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas dita a necessidade de protocolos de extração distintos (Duman et al., 2022).

Bactérias Gram-negativas, devido à sua parede celular mais delgada, frequentemente permitem uma identificação acurada através da análise direta de perfis celulares. Em contrapartida, a espessa camada de peptidoglicano das bactérias Gram-positivas requer uma etapa de perturbação química para garantir a extração eficiente das proteínas ribossomais. Para tal, um tratamento com ácido fórmico é tipicamente empregado, um passo que aumenta significativamente a qualidade do espectro de massas e, consequentemente, a confiabilidade da identificação (Singhal et al., 2015).

Uma avaliação comparativa posiciona o MALDI-TOF MS de forma vantajosa frente a outras metodologias de identificação microbiana, como as abordagens fenotípicas e moleculares convencionais. Seus principais atributos incluem a alta velocidade na obtenção de resultados e um baixo custo por análise, o que o torna particularmente atraente para laboratórios de diagnóstico (Saticioglu et al., 2021).

Contudo, a precisão do método é diretamente condicionada pela abrangência e qualidade da base de dados espectrais de referência, e seu custo de aquisição inicial representa um investimento de capital significativo (Duman et al., 2022; Piamsomboon et al., 2020).

Apesar de sua ampla consolidação no diagnóstico clínico humano e veterinário, a aplicabilidade do MALDI-TOF MS na aquicultura ainda enfrenta barreiras consideráveis. A principal limitação reside na relativa escassez de

espectros de referência para patógenos de peixes nos bancos de dados comerciais e públicos (Schumann and Maier, 2014; Saticioglu et al., 2021).

Este gargalo é exacerbado pela natureza do habitat aquático, um ecossistema complexo que abriga uma vasta e diversa microbiota, incluindo milhares de espécies bacterianas comensais e patogênicas. Uma fração significativa desta microbiota permanece não cultivável in vitro, o que impede a obtenção da cultura pura, um pré-requisito para a análise por MALDI-TOF MS, e dificulta a diferenciação de espécies filogeneticamente próximas (Singhal et al., 2015; Angeletti, 2017).

Adicionalmente, a capacidade de resolução taxonômica do MALDI-TOF MS em contextos aquícolas tem se mostrado inconsistente. Embora estudos iniciais tenham demonstrado sucesso na diferenciação de espécies de *Aeromonas* fenotipicamente similares, pesquisas subsequentes revelaram a incapacidade do método em distinguir de forma confiável novas espécies ambientais ou isoladas de peixes, especialmente quando confrontado com espécies do mesmo gênero cujos perfis genômicos são desconhecidos ou muito próximos (Schumann and Maier, 2014; Singhal et al., 2015; Saticioglu et al., 2021; Mulet et al., 2021).

A acurácia do MALDI-TOF MS na identificação de patógenos de peixes tem sido objeto de avaliação crítica. Estudos comparativos, como os conduzidos por PEREZ-SANCHO et al. (2016) e JUNG-SCHROERS et al. (2018), evidenciaram a ocorrência de erros de identificação, particularmente para gêneros de grande relevância na aquicultura, como *Aeromonas* e *Shewanella*. Contudo, apesar dessas limitações, a metodologia demonstrou um desempenho robusto e confiável na identificação de outros importantes patógenos de peixes, incluindo *Flavobacterium psychrophilum*, *Tenacibaculum maritimum*, *Yersinia ruckeri*, *Vagococcus salmoninarum* e *Lactococcus garvieae*.

Apesar da controvérsia em torno da sua acurácia para certos táxons, o MALDI-TOF MS consolida-se como uma ferramenta de elevado potencial para a identificação de patógenos em peixes. O principal desafio para a sua plena implementação reside na necessidade de uma contínua expansão e curadoria dos bancos de dados espectrais, com a inclusão de perfis de espécies raras, emergentes ou geograficamente específicas (Assis et al., 2017; Ferone et al., 2020).

Neste contexto, uma corrente de pesquisadores SCHUMANN (2014); SATICIOGLU et al. (2021) e DUMAN et al. (2022) argumentam que a dependência exclusiva do MALDI-TOF MS é insuficiente, especialmente para a caracterização de novos patógenos. Em vez disso, defendem pela adoção de uma abordagem taxonômica polifásica. Esta estratégia integrativa preconiza a conjugação dos dados proteômicos obtidos por MALDI-TOF MS com os resultados de métodos fenotípicos e moleculares clássicos, assegurando assim uma identificação bacteriana mais robusta, fidedigna e taxonomicamente coerente.

2.7 Identificação por métodos moleculares

A aplicação de métodos moleculares para a identificação de microrganismos tem como pré-requisito a obtenção de material genético (DNA ou RNA) de alta qualidade e pureza. Essas abordagens baseiam-se, em sua maioria, na amplificação de regiões genômicas conservadas por meio de técnicas como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que utiliza oligonucleotídeos iniciadores (primers) sintéticos (Duman et al., 2022).

A introdução dessas metodologias representou um avanço paradigmático para a microbiologia, não apenas por possibilitar a descoberta de inúmeros novos microrganismos, mas também por impulsionar uma profunda revisão da classificação e nomenclatura de táxons previamente estabelecidos.

A taxonomia microbiana passou a ser fundamentada em relações filogenéticas, inferidas a partir da comparação de sequências de DNA, o que permitiu a elucidação de relações de ancestralidade com um nível de resolução sem precedentes.

O progresso acelerado no campo da biologia molecular e o contínuo aprimoramento de novas plataformas de diagnóstico genético estão promovendo uma mudança de paradigma no diagnóstico de doenças em peixes. Abordagens independentes de cultivo, notadamente a detecção e identificação de genes bacterianos diretamente de tecidos do hospedeiro, têm ganhado proeminência, superando a dependência do tradicional isolamento e cultivo *in vitro* dos agentes etiológicos.

No âmbito da identificação molecular de patógenos bacterianos em peixes, os genes que codificam o RNA ribossômico (rRNA), especificamente as subunidades 5S, 16S e 23S, são alvos primordiais. Dentre estes, o gene que codifica a subunidade 16S do rRNA consolidou-se como o marcador molecular de eleição e o mais amplamente utilizado para a taxonomia e filogenia bacteriana.

A utilização do gene 16S rRNA deriva de um conjunto de características intrínsecas que o tornam um excelente cronômetro molecular. Primeiramente, sua ubiquidade, estando presente em praticamente todas as espécies bacterianas conhecidas, e sua função conservada na síntese proteica garantem sua relevância universal. Adicionalmente, sua estrutura em mosaico, que intercala regiões altamente conservadas com regiões hipervariáveis, é particularmente vantajosa.

As regiões conservadas servem como sítios de anelamento para oligonucleotídeos iniciadores universais, permitindo a amplificação do gene a partir de uma vasta gama de espécies, enquanto as regiões hipervariáveis acumulam mutações a uma taxa que permite a discriminação entre diferentes linhagens taxonômicas.

Com um comprimento aproximado de 1500 pares de bases, o gene 16S rRNA possui um tamanho ideal que facilita sua amplificação por PCR e sequenciamento, ao mesmo tempo que contém informação filogenética suficiente para permitir a identificação robusta em nível de gênero e, em muitos casos, de espécie, bem como o posicionamento preciso do organismo na árvore filogenética.

Apesar da sua inegável utilidade, a análise do gene 16S rRNA demonstrou possuir limitações em sua resolução taxonômica, sendo por vezes insuficiente para a discriminação inequívoca de espécies filogeneticamente muito próximas. A contínua prospecção de genomas bacterianos revelou que outras regiões conservadas, notadamente genes de manutenção (housekeeping genes), também detêm um valioso sinal filogenético e poderiam ser incorporadas para aumentar a robustez das análises.

Esta constatação abriu caminho para o desenvolvimento de abordagens de tipagem por sequenciamento multilocus (MLST) e análise de sequência multilocus (MLSA). Estes métodos, que se baseiam na análise concatenada de sequências de múltiplos genes de manutenção, oferecem um poder de discriminação

significativamente superior ao de análises baseadas em um único gene. Ao integrar a informação filogenética de vários loci, o MLSA proporciona uma inferência taxonômica e filogenética robusta e precisa, aliado ao sequenciamento completo do genoma da bactéria, tornando-se o padrão-ouro para a descrição de novas espécies e para estudos epidemiológicos de alta resolução, exigido pelo comite de taxonomia bacteriana (IJSEM).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Latif, H.M.R., Khafaga, A.F., 2020. Natural co-infection of cultured Nile tilapia *Oreochromis niloticus* with *Aeromonas hydrophila* and *Gyrodactylus cichlidarum* experiencing high mortality during summer. *Aquaculture Research* 51, 1880–1892. <https://doi.org/10.1111/are.14538>
- Ahmed, I., Ishtiaq, S., Sayed, S.F., 2025. An overview on understanding the major bacterial fish diseases in freshwater salmonids. *Front. Aquac.* 4, 1515831. <https://doi.org/10.3389/faquc.2025.1515831>
- Angeletti, S., 2017. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. *J Microbiol Methods* 138, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.09.003>
- Assis, G.B.N., de Oliveira, T.F., Gardner, I.A., Figueiredo, H.C.P., Leal, C. a G., 2017. Sensitivity and specificity of real-time PCR and bacteriological culture for francisellosis in farm-raised Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Journal of Fish Diseases* 40, 785–795. <https://doi.org/10.1111/jfd.12559>
- Bååth, E., Kritzberg, E.S., 2024. Temperature Adaptation of Aquatic Bacterial Community Growth Is Faster in Response to Rising than to Falling Temperature. *Microb Ecol* 87, 38. <https://doi.org/10.1007/s00248-024-02353-8>
- Cai, Y., Sun, Y., 2011. ESPRIT-Tree: hierarchical clustering analysis of millions of 16S rRNA pyrosequences in quasilinear computational time. *Nucleic Acids Res* 39, e95. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr349>
- Cao, Y., Li, S., Han, S., Wang, D., Zhao, J., Xu, L., Liu, H., Lu, T., 2020a. Characterization and application of a novel *Aeromonas* bacteriophage as

- treatment for pathogenic *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout. Aquaculture 523, 735–739. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735193>
- Chen, H., Jing, L., Teng, Y., Wang, J., 2018. Characterization of antibiotics in a large-scale river system of China: Occurrence pattern, spatiotemporal distribution and environmental risks. Science of The Total Environment 618, 409–418. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.054>
- Chen, P.-L., Wu, C.-J., Chen, C.-S., Tsai, P.-J., Tang, H.-J., Ko, W.-C., 2014. A comparative study of clinical *Aeromonas dhakensis* and *Aeromonas hydrophila* isolates in southern Taiwan: *A. dhakensis* is more predominant and virulent. Clinical Microbiology and Infection 20, O428–O434. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12456>
- Chen, Y., Wang, J., Cai, H., Lin, M., Zhang, Y., Huang, L., 2022. Enhanced Hemolytic Activity of Mesophilic *Aeromonas salmonicida* SRW-OG1 Is Brought about by Elevated Temperatures. Microorganisms 10, 2033. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10102033>
- Citterio, B., Francesca, B., 2015. *Aeromonas hydrophila* virulence. Virulence 6, 417–418. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1058479>
- D'Agaro, E., Gibertoni, P., Esposito, S., 2022. Recent Trends and Economic Aspects in the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Sector. Applied Sciences 12, 8773. <https://doi.org/10.3390/app12178773>
- De Carvalho, M.C., 2008. USO DOS ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE CARBONO, NITROGÊNIO E ENXOFRE EM ESTUDOS DE ECOLOGIA COSTEIRA. Oecol. Austr. 12, 694–705. <https://doi.org/10.4257/oeco.2009.1304.08>
- Dhanapala, P.M., Kalupahana, R.S., Kalupahana, A.W., Wijesekera, D.P.H., Kottawatta, S.A., Jayasekera, N.K., Silva-Fletcher, A., Jagoda, S.S.S. de S., 2021. Characterization and Antimicrobial Resistance of Environmental and Clinical *Aeromonas* Species Isolated from Fresh Water Ornamental Fish and Associated Farming Environment in Sri Lanka. Microorganisms 9, 2106. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102106>
- Dias, M.K.R., Sampaio, L.S., Proietti-Junior, A.A., Yoshioka, E.T.O., Rodrigues, D.P., Rodriguez, A.F.R., Ribeiro, R.A., Faria, F.S.E.D.V., Ozório, R.O.A., Tavares-Dias, M., 2016. Lethal dose and clinical signs of *Aeromonas hydrophila* in

- Arapaima gigas (Arapaimidae), the giant fish from Amazon. Vet Microbiol 188, 12–15. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.04.001>
- Duman, M., Altun, S., Saticioglu, I.B., 2022. General Assessment of Approaches to the Identification of Aquatic Bacterial Pathogens: A Methodological Review. North American Journal of Aquaculture 84, 405–426. <https://doi.org/10.1002/naaq.10260>
- Duman, M., Altun, S., Saticioglu, I.B., Romalde, J.L., 2025. A review of bacterial disease outbreaks in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reported from 2010 to 2022. Journal of Fish Diseases 48, e13886. <https://doi.org/10.1111/jfd.13886>
- Esteve, C., Birbeck, T.H., 2004. Secretion of haemolysins and proteases by *Aeromonas hydrophila* EO63: separation and characterization of the serine protease (caseinase) and the metalloprotease (elastase). J Appl Microbiol 96, 994–1001. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02227.x>
- FAO, 2024. . FAO. <https://doi.org/10.4060/cd0683en>
- FAO, 2022. . FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
- Feng, J., Sun, D., Wang, L., Li, X., Guan, J., Wei, L., Yue, D., Wang, X., Zhao, Y., Yang, H., Song, W., Wang, B., 2021. Biochanin A as an α -hemolysin inhibitor for combating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. World J Microbiol Biotechnol 38, 6. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03182-4>
- Fernández-Martínez, L.T., Javelle, A., Hoskisson, P.A., 2024. Microbial Primer: Bacterial growth kinetics. Microbiology (Reading) 170, 001428. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001428>
- Ferone, M., Gowen, A., Fanning, S., Scannell, A.G.M., 2020. Microbial detection and identification methods: Bench top assays to omics approaches. Compr Rev Food Sci Food Saf 19, 3106–3129. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12618>
- Figueiredo, H.C.P., Costa, F.A.A., Leal, C.A.G., Carvalho-Castro, G.A., Leite, R.C., 2012. *Weissella* sp. outbreaks in commercial rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Brazil. Veterinary Microbiology 156, 359–366. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.11.008>
- Figueiredo, H.C.P., Soares, S.C., Pereira, F.L., Dorella, F.A., Carvalho, A.F., Teixeira, J.P., Azevedo, V.A.C., Leal, C.A.G., 2015. Comparative genome analysis of

- Weissella ceti, an emerging pathogen of farm-raised rainbow trout. BMC Genomics 16, 1095. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2324-4>
- Grilo, M.L., Pereira, A., Sousa-Santos, C., Robalo, J.I., Oliveira, M., 2021. Climatic Alterations Influence Bacterial Growth, Biofilm Production and Antimicrobial Resistance Profiles in Aeromonas spp. Antibiotics 10, 1008. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10081008>
- Guo, S.L., Yang, Q.H., Feng, J.J., Duan, L.H., Zhao, J.P., 2016. Phylogenetic analysis of the pathogenic genus Aeromonas spp. isolated from diseased eels in China. Microbial Pathogenesis 101, 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.10.016>
- Hu, M., Wang, N., Pan, Z.H., Lu, C.P., Liu, Y.J., 2012. Identity and virulence properties of Aeromonas isolates from diseased fish, healthy controls and water environment in China. Lett. Appl. Microbiol. 55, 224–233. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03281.x>
- Huelsenbeck, J.P., 2005. Bayesian Analysis of Molecular Evolution Using MrBayes, in: Statistical Methods in Molecular Evolution, Statistics for Biology and Health. Springer-Verlag, New York, pp. 183–226. https://doi.org/10.1007/0-387-27733-1_7
- Jung-Schroers, V., Jung, A., Ryll, M., Bauer, J., Teitge, F., Steinhagen, D., 2019. Diagnostic methods for identifying different Aeromonas species and examining their pathogenicity factors, their correlation to cytotoxicity and adherence to fish mucus. J Fish Dis 42, 189–219. <https://doi.org/10.1111/jfd.12917>
- Jung-Schroers, V., Jung, A., Ryll, M., Bauer, J., Teitge, F., Steinhagen, D., 2018. Methods for identification and differentiation of different Shewanella spp. isolates for diagnostic use. J Fish Dis 41, 689–714. <https://doi.org/10.1111/jfd.12772>
- Júnior, N.T.D.A., Ianella, P., Yoshinaga, T.T., Butzge, A.J., Caetano, A.R., 2023. Population structure and genetic diversity of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) broodstocks from Brazil using SNP markers. Aquaculture Reports 31, 101689. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101689>
- Korczak, B., Christensen, H., Emler, S., Frey, J., Kuhnert, P., 2004. Phylogeny of the family Pasteurellaceae based on rpoB sequences. International Journal of

- Systematic and Evolutionary Microbiology 54, 1393–1399.
<https://doi.org/10.1099/ijls.0.03043-0>
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., Tamura, K., 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform* 9, 299–306. <https://doi.org/10.1093/bib/bbn017>
- Lee, H. -J., Hoel, S., Lunestad, B. -T., Lerfall, J., Jakobsen, A.N., 2021. *Aeromonas* spp. isolated from ready-to-eat seafood on the Norwegian market: prevalence, putative virulence factors and antimicrobial resistance. *J. Appl. Microbiol.* 130, 1380–1393. <https://doi.org/10.1111/jam.14865>
- Li, Jihong, Ma, S., Li, Z., Yu, W., Zhou, P., Ye, X., Islam, M.S., Zhang, Y.-A., Zhou, Y., Li, Jinqun, 2021. Construction and Characterization of an *Aeromonas hydrophila* Multi-Gene Deletion Strain and Evaluation of Its Potential as a Live-Attenuated Vaccine in Grass Carp. *Vaccines (Basel)* 9, 451. <https://doi.org/10.3390/vaccines9050451>
- Li, T., Guo, D., Shen, Y., Bao, J., Jin, L., 2022. Comparative analysis of bacterial communities in the sediment and seawater environments from marine large yellow croaker cages (Zhejiang coast, China). *Front. Mar. Sci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.963242>
- Liu, J.Y., Li, A.H., Ji, C., Yang, W.M., 2009. First description of a novel *Weissella* species as an opportunistic pathogen for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in China. *Veterinary Microbiology* 136, 314–320. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.11.027>
- Liu, L.-P., Fang, Y.-D., Kang, P.-T., Gao, X.-Y., Zhang, G.-W., Pan, J., Lu, J., Liu, J.-X., Zhang, W.-D., 2025a. Isolation, identification and characteristics of *Aeromonas sobria* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Front. Microbiol.* 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1499126>
- Liu, M., Yang, X., Zeng, C., Zhao, H., Li, J., Hou, Z., Wen, H., 2022. Transcriptional Signatures of Immune, Neural, and Endocrine Functions in the Brain and Kidney of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Response to *Aeromonas salmonicida* Infection. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 1340. <https://doi.org/10.3390/ijms23031340>

- Maulu, S., Hasimuna, O.J., Haambiya, L.H., Monde, C., Musuka, C.G., Makorwa, T.H., Munganga, B.P., Phiri, K.J., Nsekanabo, J.D., 2021. Climate Change Effects on Aquaculture Production: Sustainability Implications, Mitigation, and Adaptations. *Front. Sustain. Food Syst.* 5, 609097. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.609097>
- Medina, M., Fernandez-Espinel, C., Sotil, G., Yunis-Aguinaga, J., Flores-Dominick, V., 2020. First description of *Weissella ceti* associated with mortalities in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Peru. *Aquaculture* 529, 735608. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735608>
- Milijasevic, M., Veskovic-Moracanin, S., Babic Milijasevic, J., Petrovic, J., Nastasijevic, I., 2024. Antimicrobial Resistance in Aquaculture: Risk Mitigation within the One Health Context. *Foods* 13, 2448. <https://doi.org/10.3390/foods13152448>
- Mitomi, K., Hoai, T.D., Nishiki, I., Yoshida, T., 2018. First isolation of *Weissella ceti* responsible for outbreaks of weissellosis in farmed rainbow trout in Japan. *Journal of Fish Diseases* 41, 847–850. <https://doi.org/10.1111/jfd.12787>
- Moreira, E.A., Silva, D.D.P., 2023. Uma dúzia de peixes: algumas espécies exóticas invasoras encontradas em águas brasileiras e seus impactos. *Ciênc. anim. bras.* 24, e-74647E. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v24e-74647p>
- Mulet, M., Duman, M., Altun, S., Saticioglu, I.B., Gomila, M., Matthijs, S., Lalucat, J., Garcia-Valdes, E., 2021. *Pseudomonas arcuscaelestis* sp. nov., isolated from rainbow trout and water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 71, 004860. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004860>
- Mundim, K.C., Baraldi, S., Machado, H.G., Vieira, F.M.C., 2020. Temperature coefficient (Q10) and its applications in biological systems: Beyond the Arrhenius theory. *Ecological Modelling* 431, 109127. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2020.109127>
- Nhinh, D.T., Le, D.V., Van, K.V., Huong Giang, N.T., Dang, L.T., Hoai, T.D., 2021. Prevalence, Virulence Gene Distribution and Alarming the Multidrug Resistance of *Aeromonas hydrophila* Associated with Disease Outbreaks in Freshwater Aquaculture. *Antibiotics* 10, 532. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050532>

- Oren, A., Arahal, D.R., Göker, M., Moore, E.R.B., Rossello-Mora, R., Sutcliffe, I.C., 2023. International Code of Nomenclature of Prokaryotes. Prokaryotic Code (2022 Revision). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 73. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005585>
- Parter, M., Kashtan, N., Alon, U., 2007. Environmental variability and modularity of bacterial metabolic networks. BMC Evol Biol 7, 169. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-169>
- Pattanayak, S., Priyadarsini, S., Paul, A., Kumar, P.R., Sahoo, P.K., 2020. Diversity of virulence-associated genes in pathogenic *Aeromonas hydrophila* isolates and their in vivo modulation at varied water temperatures. Microb Pathog 147, 104424. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104424>
- Pereira, F.L., Dorella, F.A., Castrejón-Nájera, J., Reis, F.Y.T., Ortega, C., Irgang, R., Echeverría-Bugueño, M., Avendaño-Herrera, R., Figueiredo, H.C.P., 2022. Comparative polyphasic characterization of *Weissella* strains isolated from beaked whale and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): confirmation of *Weissella ceti* sp. nov. and description of the novel *Weissella tructae* sp. nov. isolated from farmed rainbow trout. Braz J Microbiol 53, 2263–2272. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00856-5>
- Perez-Sancho, M., Vela Ana, I., Awad, M., Kostrzewa, M., Dominguez, L., Francisco Fernandez-Garayzabal, J., 2016. Differentiation of *Photobacterium damsela* subspecies using Matrix-Assisted Laser-Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in fish isolates. Aquaculture 464, 159–164. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.06.024>
- Piamsomboon, P., Jaresitthikunchai, J., Hung, T.Q., Roytrakul, S., Wongtavatchai, J., 2020. Identification of bacterial pathogens in cultured fish with a custom peptide database constructed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). BMC Vet Res 16, 52. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-2274-1>
- Porto-Foresti, F., Oliveira, C., Tabata, Y.A., Rigolino, M.G., Foresti, F., 2002. Analysis of NOR distribution in cultivated and naturalized stocks of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Genet. Mol. Biol. 25, 409–412. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572002000400009>

- Qian, Y., Xia, L., Wei, L., Li, D., Jiang, W., 2021. Artesunate inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation by reducing alpha-toxin synthesis. *Arch Microbiol* 203, 707–717. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02077-6>
- Riesco, R., Trujillo, M.E., 2024. Update on the proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 74, 006300. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.006300>
- Romero, J., 2012. Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse and Alternatives, in: Carvalho, E. (Ed.), *Health and Environment in Aquaculture*. InTech. <https://doi.org/10.5772/28157>
- Rostang, A., Bachelet, F., Fournel, C., Carabin, T., Navarro-Gonzalez, N., Calvez, S., 2025. Susceptibility of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* bacteria from French farmed trout to antibiotics commonly used in fish farming, and attempt to set epidemiological cut-off values. *Front. Microbiol.* 16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1532748>
- Saticioglu, I.B., Isbilir, F., Yavas, O., Avci, Z., Ozdemir, B., Suzer, B., Altun, S., Duman, M., 2021. Description of lens atrophy caused by *Shewanella* sp. strain S-1, a putative novel species isolated from cultured rainbow trout. *Aquaculture* 541, 736779. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736779>
- Schumann, P., Maier, T., 2014. MALDI-TOF Mass Spectrometry Applied to Classification and Identification of Bacteria, in: Goodfellow, M., Sutcliffe, I., Chun, J. (Eds.), *New Approaches to Prokaryotic Systematics, Methods in Microbiology*. Elsevier Academic Press Inc, San Diego, pp. 275–306. <https://doi.org/10.1016/bs.mim.2014.06.002>
- Sebastião, F.A., Furlan, L.R., Hashimoto, D.T., Pilarski, F., 2015. Identification of Bacterial Fish Pathogens in Brazil by Direct Colony PCR and 16S rRNA Gene Sequencing. *Advances in Microbiology* 5, 409–424. <https://doi.org/10.4236/aim.2015.56042>
- Sha, J., Kozlova, E.V., Chopra, A.K., 2002. Role of various enterotoxins in *Aeromonas hydrophila*-induced gastroenteritis: generation of enterotoxin gene-deficient mutants and evaluation of their enterotoxic activity. *Infect Immun* 70, 1924–1935. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.4.1924-1935.2002>

- Shao, G.-Y., Wang, S.-Y., Jiang, X.-S., Tian, Q.-Q., Lu, Y.-X., Cheng, B.-X., Liu, F., 2023. Isolation, identification and characterization of *Aeromonas allosaccharophila* from infected farmed leech (*Whitmania pigra*) in Jiangsu, China. *Aquaculture* 576, 739867. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739867>
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P.K., Virdi, J.S., 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>
- Stanković, D., Crivelli, A.J., Snoj, A., 2015. Rainbow Trout in Europe: Introduction, Naturalization, and Impacts. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*.
- Stentiford, G.D., Sritunyalucksana, K., Flegel, T.W., Williams, B.A.P., Withyachumnarnkul, B., Itsathitphaisarn, O., Bass, D., 2017. New Paradigms to Help Solve the Global Aquaculture Disease Crisis. *PLoS Pathog* 13, e1006160. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006160>
- Swinnen, I.A.M., Bernaerts, K., Dens, E.J.J., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F., 2004. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 137–159. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.006>
- Thi Ninh, D., Thi Hoa, D., Thi Trinh, T., Van Tung, M., Thi Huong Giang, N., Van Van, K., Hoai, T.D., 2025. First insights into *Weissella tructae* infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Vietnam: Bacterial characterization, pathogenicity and antimicrobial susceptibility. *Aquaculture Reports* 43, 102955. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2025.102955>
- Waltman, W.D., Shotts, E.B., Hsu, T.C., 1982. Enzymatic characterization of *Aeromonas hydrophila* complex by the API ZYM system. *J Clin Microbiol* 16, 692–696. <https://doi.org/10.1128/jcm.16.4.692-696.1982>
- Wang, B., Mao, C., Feng, J., Li, Y., Hu, J., Jiang, B., Gu, Q., Su, Y., 2021. A First Report of *Aeromonas veronii* Infection of the Sea Bass, *Lateolabrax maculatus* in China. *Front. Vet. Sci.* 7, 600587. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.600587>
- Wang, G., Clark, C.G., Liu, C., Pucknell, C., Munro, C.K., Kruk, T.M.A.C., Caldeira, R., Woodward, D.L., Rodgers, F.G., 2003. Detection and Characterization of the Hemolysin Genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by

Multiplex PCR. J Clin Microbiol 41, 1048–1054.

<https://doi.org/10.1128/JCM.41.3.1048-1054.2003>

Welch, T.J., Good, C.M., 2013. Mortality associated with Weissellosis (*Weissella* sp.) in USA farmed rainbow trout: Potential for control by vaccination. Aquaculture 388–391, 122–127. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.01.021>

Yáñez, M.A., Catalán, V., Apráiz, D., Figueras, M.J., Martínez-Murcia, A.J., 2003. Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53, 875–883. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02443-0>

Yano, Y., Hamano, K., Tsutsui, I., Aue-Urneoy, D., Ban, M., Satomi, M., 2015. Occurrence, molecular characterization, and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp. in marine species of shrimps cultured at inland low salinity ponds. Food Microbiol 47, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.003>

ZHOU, Y., FAN, Y., JIANG, N., LIU, W., SHI, Y., ZHAO, J., ZENG, L., 2018. Molecular characteristics and virulence analysis of eight *Aeromonas hydrophila* isolates obtained from diseased Amur sturgeon *Acipenser schrenckii* Brandt, 1869. J Vet Med Sci 80, 421–426. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0529>

5 Conclusão

A combinação de análises filogenéticas e moleculares permitiu não apenas a identificação taxonômica precisa, mas também a elucidação da dinâmica epidemiológica e do potencial patogênico das cepas envolvidas no estudo. A análise das sequências, dos genes 16S rRNA, *gyrB* e *rpoB*, foi fundamental para confirmar a identidade das cepas como *A. hydrophila*, superando as limitações de métodos baseados apenas no gene 16S rRNA. A análise filogenética subsequente, baseada no concatenamento dessas sequências, revelou o posicionamento evolutivo das cepas em relação a linhagens de referência.

A caracterização molecular do perfil de virulência demonstrou que as cepas isoladas são dotadas de fatores de virulência semelhantes, com a detecção de 9/12 genes testados. A presença concomitante desses genes justifica a alta virulência.

6 Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 pela concessão da bolsa de estudos a Amarildo Petim Siragi Ussene.

7 Referências bibliográficas

- Abdel-Latif, H.M.R., Khafaga, A.F., 2020. Natural co-infection of cultured Nile tilapia *Oreochromis niloticus* with *Aeromonas hydrophila* and *Gyrodactylus cichlidarum* experiencing high mortality during summer. *Aquaculture Research* 51, 1880–1892. <https://doi.org/10.1111/are.14538>
- Ahmed, I., Ishtiyag, S., Sayed, S.F., 2025. An overview on understanding the major bacterial fish diseases in freshwater salmonids. *Front. Aquac.* 4, 1515831. <https://doi.org/10.3389/faquc.2025.1515831>
- Angeletti, S., 2017. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. *J Microbiol Methods* 138, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.09.003>
- Assis, G.B.N., de Oliveira, T.F., Gardner, I.A., Figueiredo, H.C.P., Leal, C. a G., 2017. Sensitivity and specificity of real-time PCR and bacteriological culture for francisellosis in farm-raised Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Journal of Fish Diseases* 40, 785–795. <https://doi.org/10.1111/jfd.12559>
- Bååth, E., Kritzberg, E.S., 2024. Temperature Adaptation of Aquatic Bacterial Community Growth Is Faster in Response to Rising than to Falling Temperature. *Microb Ecol* 87, 38. <https://doi.org/10.1007/s00248-024-02353-8>
- Cai, Y., Sun, Y., 2011. ESPRIT-Tree: hierarchical clustering analysis of millions of 16S rRNA pyrosequences in quasilinear computational time. *Nucleic Acids Res* 39, e95. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr349>
- Cao, Y., Li, S., Han, S., Wang, D., Zhao, J., Xu, L., Liu, H., Lu, T., 2020a. Characterization and application of a novel *Aeromonas* bacteriophage as treatment for pathogenic *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout. *Aquaculture* 523, 735193. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735193>
- Chen, H., Jing, L., Teng, Y., Wang, J., 2018. Characterization of antibiotics in a large-scale river system of China: Occurrence pattern, spatiotemporal distribution

- and environmental risks. *Science of The Total Environment* 618, 409–418. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.054>
- Chen, P.-L., Wu, C.-J., Chen, C.-S., Tsai, P.-J., Tang, H.-J., Ko, W.-C., 2014. A comparative study of clinical *Aeromonas dhakensis* and *Aeromonas hydrophila* isolates in southern Taiwan: *A. dhakensis* is more predominant and virulent. *Clinical Microbiology and Infection* 20, O428–O434. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12456>
- Chen, Y., Wang, J., Cai, H., Lin, M., Zhang, Y., Huang, L., 2022. Enhanced Hemolytic Activity of Mesophilic *Aeromonas salmonicida* SRW-OG1 Is Brought about by Elevated Temperatures. *Microorganisms* 10, 2033. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10102033>
- Citterio, B., Francesca, B., 2015. *Aeromonas hydrophila* virulence. *Virulence* 6, 417–418. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1058479>
- D'Agaro, E., Gibertoni, P., Esposito, S., 2022. Recent Trends and Economic Aspects in the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Sector. *Applied Sciences* 12, 8773. <https://doi.org/10.3390/app12178773>
- De Carvalho, M.C., 2008. USO DOS ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE CARBONO, NITROGÊNIO E ENXOFRE EM ESTUDOS DE ECOLOGIA COSTEIRA. *Oecol. Austr.* 12, 694–705. <https://doi.org/10.4257/oeco.2009.1304.08>
- Dhanapala, P.M., Kalupahana, R.S., Kalupahana, A.W., Wijesekera, D.P.H., Kottawatta, S.A., Jayasekera, N.K., Silva-Fletcher, A., Jagoda, S.S.S. de S., 2021. Characterization and Antimicrobial Resistance of Environmental and Clinical *Aeromonas* Species Isolated from Fresh Water Ornamental Fish and Associated Farming Environment in Sri Lanka. *Microorganisms* 9, 2106. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102106>
- Dias, M.K.R., Sampaio, L.S., Proietti-Junior, A.A., Yoshioka, E.T.O., Rodrigues, D.P., Rodriguez, A.F.R., Ribeiro, R.A., Faria, F.S.E.D.V., Ozório, R.O.A., Tavares-Dias, M., 2016. Lethal dose and clinical signs of *Aeromonas hydrophila* in *Arapaima gigas* (Arapaimidae), the giant fish from Amazon. *Vet Microbiol* 188, 12–15. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.04.001>
- Duman, M., Altun, S., Saticioglu, I.B., 2022. General Assessment of Approaches to the Identification of Aquatic Bacterial Pathogens: A Methodological Review.

- North American Journal of Aquaculture 84, 405–426.
<https://doi.org/10.1002/naaq.10260>
- Duman, M., Altun, S., Satıcıoglu, I.B., Romalde, J.L., 2025. A review of bacterial disease outbreaks in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reported from 2010 to 2022. Journal of Fish Diseases 48, e13886.
<https://doi.org/10.1111/jfd.13886>
- Esteve, C., Birbeck, T.H., 2004. Secretion of haemolysins and proteases by *Aeromonas hydrophila* EO63: separation and characterization of the serine protease (caseinase) and the metalloprotease (elastase). J Appl Microbiol 96, 994–1001. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02227.x>
- FAO, 2024. . FAO. <https://doi.org/10.4060/cd0683en>
- FAO, 2022. . FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
- Feng, J., Sun, D., Wang, L., Li, X., Guan, J., Wei, L., Yue, D., Wang, X., Zhao, Y., Yang, H., Song, W., Wang, B., 2021. Biochanin A as an α -hemolysin inhibitor for combating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. World J Microbiol Biotechnol 38, 6. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03182-4>
- Fernández-Martínez, L.T., Javelle, A., Hoskisson, P.A., 2024. Microbial Primer: Bacterial growth kinetics. Microbiology (Reading) 170, 001428.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.001428>
- Ferone, M., Gowen, A., Fanning, S., Scannell, A.G.M., 2020. Microbial detection and identification methods: Bench top assays to omics approaches. Compr Rev Food Sci Food Saf 19, 3106–3129. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12618>
- Figueiredo, H.C.P., Costa, F.A.A., Leal, C.A.G., Carvalho-Castro, G.A., Leite, R.C., 2012. *Weissella* sp. outbreaks in commercial rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Brazil. Veterinary Microbiology 156, 359–366.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.11.008>
- Figueiredo, H.C.P., Soares, S.C., Pereira, F.L., Dorella, F.A., Carvalho, A.F., Teixeira, J.P., Azevedo, V.A.C., Leal, C.A.G., 2015. Comparative genome analysis of *Weissella ceti*, an emerging pathogen of farm-raised rainbow trout. BMC Genomics 16, 1095. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2324-4>
- Grilo, M.L., Pereira, A., Sousa-Santos, C., Robalo, J.I., Oliveira, M., 2021. Climatic Alterations Influence Bacterial Growth, Biofilm Production and Antimicrobial

- Resistance Profiles in *Aeromonas* spp. *Antibiotics* 10, 1008. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10081008>
- Guo, S.L., Yang, Q.H., Feng, J.J., Duan, L.H., Zhao, J.P., 2016. Phylogenetic analysis of the pathogenic genus *Aeromonas* spp. isolated from diseased eels in China. *Microbial Pathogenesis* 101, 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.10.016>
- Hu, M., Wang, N., Pan, Z.H., Lu, C.P., Liu, Y.J., 2012. Identity and virulence properties of *Aeromonas* isolates from diseased fish, healthy controls and water environment in China. *Lett. Appl. Microbiol.* 55, 224–233. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03281.x>
- Huelsenbeck, J.P., 2005. Bayesian Analysis of Molecular Evolution Using MrBayes, in: *Statistical Methods in Molecular Evolution, Statistics for Biology and Health*. Springer-Verlag, New York, pp. 183–226. https://doi.org/10.1007/0-387-27733-1_7
- Jung-Schroers, V., Jung, A., Ryll, M., Bauer, J., Teitge, F., Steinhagen, D., 2019. Diagnostic methods for identifying different *Aeromonas* species and examining their pathogenicity factors, their correlation to cytotoxicity and adherence to fish mucus. *J Fish Dis* 42, 189–219. <https://doi.org/10.1111/jfd.12917>
- Jung-Schroers, V., Jung, A., Ryll, M., Bauer, J., Teitge, F., Steinhagen, D., 2018. Methods for identification and differentiation of different *Shewanella* spp. isolates for diagnostic use. *J Fish Dis* 41, 689–714. <https://doi.org/10.1111/jfd.12772>
- Júnior, N.T.D.A., Ianella, P., Yoshinaga, T.T., Butzge, A.J., Caetano, A.R., 2023. Population structure and genetic diversity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) broodstocks from Brazil using SNP markers. *Aquaculture Reports* 31, 101689. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101689>
- Korczak, B., Christensen, H., Emler, S., Frey, J., Kuhnert, P., 2004. Phylogeny of the family Pasteurellaceae based on *rpoB* sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1393–1399. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.03043-0>

- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., Tamura, K., 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform* 9, 299–306. <https://doi.org/10.1093/bib/bbn017>
- Lee, H. -J., Hoel, S., Lunestad, B. -T., Lerfall, J., Jakobsen, A.N., 2021. *Aeromonas* spp. isolated from ready-to-eat seafood on the Norwegian market: prevalence, putative virulence factors and antimicrobial resistance. *J. Appl. Microbiol.* 130, 1380–1393. <https://doi.org/10.1111/jam.14865>
- Li, Jihong, Ma, S., Li, Z., Yu, W., Zhou, P., Ye, X., Islam, M.S., Zhang, Y.-A., Zhou, Y., Li, Jinqian, 2021. Construction and Characterization of an *Aeromonas hydrophila* Multi-Gene Deletion Strain and Evaluation of Its Potential as a Live-Attenuated Vaccine in Grass Carp. *Vaccines (Basel)* 9, 451. <https://doi.org/10.3390/vaccines9050451>
- Li, T., Guo, D., Shen, Y., Bao, J., Jin, L., 2022. Comparative analysis of bacterial communities in the sediment and seawater environments from marine large yellow croaker cages (Zhejiang coast, China). *Front. Mar. Sci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.963242>
- Liu, J.Y., Li, A.H., Ji, C., Yang, W.M., 2009. First description of a novel *Weissella* species as an opportunistic pathogen for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in China. *Veterinary Microbiology* 136, 314–320. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.11.027>
- Liu, L.-P., Fang, Y.-D., Kang, P.-T., Gao, X.-Y., Zhang, G.-W., Pan, J., Lu, J., Liu, J.-X., Zhang, W.-D., 2025a. Isolation, identification and characteristics of *Aeromonas sobria* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Front. Microbiol.* 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1499126>
- Liu, L.-P., Fang, Y.-D., Kang, P.-T., Gao, X.-Y., Zhang, G.-W., Pan, J., Lu, J., Liu, J.-X., Zhang, W.-D., 2025b. Isolation, identification and characteristics of *Aeromonas sobria* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Front. Microbiol.* 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1499126>
- Liu, M., Yang, X., Zeng, C., Zhao, H., Li, J., Hou, Z., Wen, H., 2022. Transcriptional Signatures of Immune, Neural, and Endocrine Functions in the Brain and Kidney of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Response to *Aeromonas*

- salmonicida Infection. International Journal of Molecular Sciences 23, 1340. <https://doi.org/10.3390/ijms23031340>
- Maulu, S., Hasimuna, O.J., Haambiya, L.H., Monde, C., Musuka, C.G., Makorwa, T.H., Munganga, B.P., Phiri, K.J., Nsekanabo, J.D., 2021. Climate Change Effects on Aquaculture Production: Sustainability Implications, Mitigation, and Adaptations. Front. Sustain. Food Syst. 5, 609097. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.609097>
- Medina, M., Fernandez-Espinel, C., Sotil, G., Yunis-Aguinaga, J., Flores-Dominick, V., 2020. First description of *Weissella ceti* associated with mortalities in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Peru. Aquaculture 529, 735608. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735608>
- Milijasevic, M., Veskovic-Moracanin, S., Babic Milijasevic, J., Petrovic, J., Nastasijevic, I., 2024. Antimicrobial Resistance in Aquaculture: Risk Mitigation within the One Health Context. Foods 13, 2448. <https://doi.org/10.3390/foods13152448>
- Mitomi, K., Hoai, T.D., Nishiki, I., Yoshida, T., 2018. First isolation of *Weissella ceti* responsible for outbreaks of weissellosis in farmed rainbow trout in Japan. Journal of Fish Diseases 41, 847–850. <https://doi.org/10.1111/jfd.12787>
- Moreira, E.A., Silva, D.D.P., 2023. Uma dúzia de peixes: algumas espécies exóticas invasoras encontradas em águas brasileiras e seus impactos. Ciênc. anim. bras. 24, e-74647E. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v24e-74647p>
- Mulet, M., Duman, M., Altun, S., Saticioglu, I.B., Gomila, M., Matthijs, S., Lalucat, J., Garcia-Valdes, E., 2021. *Pseudomonas arcuscaelestis* sp. nov., isolated from rainbow trout and water. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 71, 004860. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004860>
- Mundim, K.C., Baraldi, S., Machado, H.G., Vieira, F.M.C., 2020. Temperature coefficient (Q10) and its applications in biological systems: Beyond the Arrhenius theory. Ecological Modelling 431, 109127. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2020.109127>
- Nhinh, D.T., Le, D.V., Van, K.V., Huong Giang, N.T., Dang, L.T., Hoai, T.D., 2021. Prevalence, Virulence Gene Distribution and Alarming the Multidrug Resistance of *Aeromonas hydrophila* Associated with Disease Outbreaks in

- Freshwater Aquaculture. Antibiotics 10, 532.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics10050532>
- Oren, A., Arahal, D.R., Göker, M., Moore, E.R.B., Rossello-Mora, R., Sutcliffe, I.C., 2023. International Code of Nomenclature of Prokaryotes. Prokaryotic Code (2022 Revision). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 73. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005585>
- Parter, M., Kashtan, N., Alon, U., 2007. Environmental variability and modularity of bacterial metabolic networks. BMC Evol Biol 7, 169.
<https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-169>
- Pattanayak, S., Priyadarsini, S., Paul, A., Kumar, P.R., Sahoo, P.K., 2020. Diversity of virulence-associated genes in pathogenic *Aeromonas hydrophila* isolates and their in vivo modulation at varied water temperatures. Microb Pathog 147, 104424. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104424>
- Pereira, F.L., Dorella, F.A., Castrejón-Nájera, J., Reis, F.Y.T., Ortega, C., Irgang, R., Echeverría-Bugueño, M., Avendaño-Herrera, R., Figueiredo, H.C.P., 2022. Comparative polyphasic characterization of *Weissella* strains isolated from beaked whale and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): confirmation of *Weissella ceti* sp. nov. and description of the novel *Weissella tructae* sp. nov. isolated from farmed rainbow trout. Braz J Microbiol 53, 2263–2272.
<https://doi.org/10.1007/s42770-022-00856-5>
- Perez-Sancho, M., Vela Ana, I., Awad, M., Kostrzewa, M., Dominguez, L., Francisco Fernandez-Garayzabal, J., 2016. Differentiation of *Photobacterium damsela* subspecies using Matrix-Assisted Laser-Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in fish isolates. Aquaculture 464, 159–164. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.06.024>
- Piamsomboon, P., Jaresitthikunchai, J., Hung, T.Q., Roytrakul, S., Wongtavatchai, J., 2020. Identification of bacterial pathogens in cultured fish with a custom peptide database constructed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). BMC Vet Res 16, 52.
<https://doi.org/10.1186/s12917-020-2274-1>
- Porto-Foresti, F., Oliveira, C., Tabata, Y.A., Rigolino, M.G., Foresti, F., 2002. Analysis of NOR distribution in cultivated and naturalized stocks of rainbow

- trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Genet. Mol. Biol.* 25, 409–412.
<https://doi.org/10.1590/S1415-47572002000400009>
- Qian, Y., Xia, L., Wei, L., Li, D., Jiang, W., 2021. Artesunate inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation by reducing alpha-toxin synthesis. *Arch Microbiol* 203, 707–717. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02077-6>
- Riesco, R., Trujillo, M.E., 2024. Update on the proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 74, 006300.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.006300>
- Romero, J., 2012. Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse and Alternatives, in: Carvalho, E. (Ed.), *Health and Environment in Aquaculture*. InTech.
<https://doi.org/10.5772/28157>
- Rostang, A., Bachelet, F., Fournel, C., Carabin, T., Navarro-Gonzalez, N., Calvez, S., 2025. Susceptibility of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* bacteria from French farmed trout to antibiotics commonly used in fish farming, and attempt to set epidemiological cut-off values. *Front. Microbiol.* 16.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1532748>
- Saticioglu, I.B., Isbilir, F., Yavas, O., Avci, Z., Ozdemir, B., Suzer, B., Altun, S., Duman, M., 2021. Description of lens atrophy caused by *Shewanella* sp. strain S-1, a putative novel species isolated from cultured rainbow trout. *Aquaculture* 541, 736779. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736779>
- Schumann, P., Maier, T., 2014. MALDI-TOF Mass Spectrometry Applied to Classification and Identification of Bacteria, in: Goodfellow, M., Sutcliffe, I., Chun, J. (Eds.), *New Approaches to Prokaryotic Systematics, Methods in Microbiology*. Elsevier Academic Press Inc, San Diego, pp. 275–306.
<https://doi.org/10.1016/bs.mim.2014.06.002>
- Sebastião, F.A., Furlan, L.R., Hashimoto, D.T., Pilarski, F., 2015. Identification of Bacterial Fish Pathogens in Brazil by Direct Colony PCR and 16S rRNA Gene Sequencing. *Advances in Microbiology* 5, 409–424.
<https://doi.org/10.4236/aim.2015.56042>
- Sha, J., Kozlova, E.V., Chopra, A.K., 2002. Role of various enterotoxins in *Aeromonas hydrophila*-induced gastroenteritis: generation of enterotoxin

- gene-deficient mutants and evaluation of their enterotoxic activity. *Infect Immun* 70, 1924–1935. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.4.1924-1935.2002>
- Shao, G.-Y., Wang, S.-Y., Jiang, X.-S., Tian, Q.-Q., Lu, Y.-X., Cheng, B.-X., Liu, F., 2023. Isolation, identification and characterization of *Aeromonas allosaccharophila* from infected farmed leech (*Whitmania pigra*) in Jiangsu, China. *Aquaculture* 576, 739867. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739867>
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P.K., Viridi, J.S., 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>
- Stanković, D., Crivelli, A.J., Snoj, A., 2015. Rainbow Trout in Europe: Introduction, Naturalization, and Impacts. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*.
- Stentiford, G.D., Sritunyalucksana, K., Flegel, T.W., Williams, B.A.P., Withyachumnarnkul, B., Itsathitphaisarn, O., Bass, D., 2017. New Paradigms to Help Solve the Global Aquaculture Disease Crisis. *PLoS Pathog* 13, e1006160. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006160>
- Swinnen, I.A.M., Bernaerts, K., Dens, E.J.J., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F., 2004. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 137–159. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.006>
- Thi Ninh, D., Thi Hoa, D., Thi Trinh, T., Van Tung, M., Thi Huong Giang, N., Van Van, K., Hoai, T.D., 2025. First insights into *Weissella tructae* infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Vietnam: Bacterial characterization, pathogenicity and antimicrobial susceptibility. *Aquaculture Reports* 43, 102955. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2025.102955>
- Waltman, W.D., Shotts, E.B., Hsu, T.C., 1982. Enzymatic characterization of *Aeromonas hydrophila* complex by the API ZYM system. *J Clin Microbiol* 16, 692–696. <https://doi.org/10.1128/jcm.16.4.692-696.1982>
- Wang, B., Mao, C., Feng, J., Li, Y., Hu, J., Jiang, B., Gu, Q., Su, Y., 2021. A First Report of *Aeromonas veronii* Infection of the Sea Bass, *Lateolabrax maculatus* in China. *Front. Vet. Sci.* 7, 600587. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.600587>

- Wang, G., Clark, C.G., Liu, C., Pucknell, C., Munro, C.K., Kruk, T.M.A.C., Caldeira, R., Woodward, D.L., Rodgers, F.G., 2003. Detection and Characterization of the Hemolysin Genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by Multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 41, 1048–1054. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.3.1048-1054.2003>
- Welch, T.J., Good, C.M., 2013. Mortality associated with Weisselosis (*Weissella* sp.) in USA farmed rainbow trout: Potential for control by vaccination. *Aquaculture* 388–391, 122–127. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.01.021>
- Yáñez, M.A., Catalán, V., Apráiz, D., Figueras, M.J., Martínez-Murcia, A.J., 2003. Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 875–883. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02443-0>
- Yano, Y., Hamano, K., Tsutsui, I., Aue-Umneoy, D., Ban, M., Satomi, M., 2015. Occurrence, molecular characterization, and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp. in marine species of shrimps cultured at inland low salinity ponds. *Food Microbiol* 47, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.003>
- ZHOU, Y., FAN, Y., JIANG, N., LIU, W., SHI, Y., ZHAO, J., ZENG, L., 2018. Molecular characteristics and virulence analysis of eight *Aeromonas hydrophila* isolates obtained from diseased Amur sturgeon *Acipenser schrenckii* Brandt, 1869. *J Vet Med Sci* 80, 421–426. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0529>