

INOCULAÇÃO BACTERIANA DE *Aeromonas hydrophila* E A SOBREVIVÊNCIA DE JUVENIS DE JUNDIÁ, *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI: PIMELODIDAE)¹

INOCULATION WITH *Aeromonas hydrophila* BACTERIA AND THE SURVIVAL OF JUVENILE JUNDIÁ, *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI: PIMELODIDA)

Cheila de Lima Bojink² Deodoro Atlante Brandão³

RESUMO

Visando a estudar a resistência do jundiá (*Rhamdia quelen*), é que se inoculou, por via intramuscular, as suspensões de $1,3 \times 10^9$ e $3,5 \times 10^8$ UFC (Unidades Formadoras de Colônia) de *Aeromonas hydrophila*/mℓ de solução salina. Dos 96 juvenis submetidos à inoculação, distribuídos em seis caixas d'água de amianto, 32 constituíram o grupo controle, em que os animais foram injetados com solução salina esterilizada. A partir do momento da inoculação de 1mℓ do respectivo tratamento, foi observado que os peixes inoculados com a bactéria tiveram seu comportamento alterado, permaneceram estáticos no fundo da caixa e apresentaram 100% de mortalidade em 24 horas. Os peixes do grupo controle injetados com salina não apresentaram nenhuma anormalidade no comportamento. Sendo assim, é possível concluir que as concentrações $1,3 \times 10^9$ e $3,5 \times 10^8$ UFC/mℓ de solução salina são letais para juvenis de jundiá.

Palavras-chave: *Rhamdia quelen*, *Aeromonas hydrophila*, peixe, inoculação.

SUMMARY

The present work studied the resistance of the "Jundiá" (*Rhamdia quelen*), after intramuscular inoculation with 1.3×10^9 and 3.5×10^8 UFC (Unity Formation of Colony) suspension of *Aeromonas hydrophila*/mℓ saline solution. Thirty two fish of a total of 96 utilized fish served as control that were inoculated with saline solution. Fish were distributed in six amianthus aquarium. After inoculation, fish submitted to bacterial suspensions showed behaviour changes and apathy at the bottom of aquarium. One hundred percent of mortality was observed 24 hours after inoculation. In conclusion, 1.3×10^9 and 3.5×10^8 UFC/mℓ saline solution were lethal for this species of fish.

Key words: *Rhamdia quelen*, *Aeromonas hydrophila*, fish, inoculation.

INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento da piscicultura e da criação intensiva, há aumento da incidência e severidade de doenças bacterianas, assim como a introdução e disseminação de novas enfermidades (AUSTIN & AUSTIN, 1987). Das doenças infecciosas em peixes, as de origem bacteriana têm apresentado maior significância patogênica em cultivo intensivo (THUNE *et al.*, 1993).

Fazendo parte da microbiota da água de rios e tanques, as bactérias podem intensificar seu potencial patogênico quando as condições físicas e químicas do ambiente estiverem alteradas (WALTERS & PLUMB, 1980). A maioria desses organismos são naturalmente saprófitas que utilizam a matéria orgânica e mineral do ambiente aquático para seu crescimento e multiplicação. Entretanto, quando surge a oportunidade, esses organismos são capazes de invadir o ambiente nutricionalmente vantajoso dos tecidos dos peixes e iniciarem processos de doenças (FRERICHS, 1989). O manejo inadequado do peixe está associado com excitação, aumento da atividade do indivíduo, aumento da concentração plasmática de cortisol, incremento do lactato no sangue e danos na superfície do corpo (LEWIS, 1971). Segundo RICHARDS e ROBERTS (1978), os métodos de cultivo intensivo induzem estresse, e os bacilos gram-negativos são os que provocam maior mortalidade. Muitos dos patógenos como *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas*

¹Parte da Dissertação de Mestrado apresentada pelo primeiro autor para obtenção do título de Mestre junto ao Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, (UFSM).

²Biólogo, Aluno do Curso de Mestrado em Zootecnia, Centro de Ciências Rurais, (CCR), UFSM.

³Biólogo, PhD., Professor Titular do Departamento de Zootecnia, CCR, UFSM, 97105-900 Santa Maria, RS. E-mail: dabrandao@pro.viars.com.br. Autor para correspondência.

fluorescens, *Vibrio anguillarum* e *Edwardsiella tarda* são considerados oportunistas, e fazem parte da microbiota da água, pele, brânquias e intestino dos peixes, quando há desequilíbrio dos sistemas bactéria-hospedeiro-ambiente, podem desencadear epizootias (BARJA & ESTEVES, 1988).

Conforme LEWIS & PLUMB (1979), *A. hydrophila* é responsável pela indução de sérias epidemias de doenças ulcerativas em várias regiões do mundo. No Brasil, as bactérias do gênero *Aeromonas* são descritas como patógenos emergentes de importância crescente em alimentos. Em São Paulo, foi relatado que 48% das amostras de "pintado" (*Pseudoplatystoma* sp.), coletadas no comércio, foram positivas para *Aeromonas* (RALL *et al.* 1998). SHAMA *et al.* (2000), isolando e identificando bactérias patogênicas em jundiás criados em tanque em Santa Maria (RS), observaram que *A. hydrophila* apareceu em 6% dos animais examinados. De acordo com PLUMB (1994), perda de apetite, apatia, perda de equilíbrio, lesões epidérmicas como despigmentação, necroses da pele, úlceras com exposição da musculatura e alterações no comportamento são geralmente observadas como sinais clínicos causados por *A. hydrophila*. Internamente, os órgãos podem estar friáveis e esbranquiçados, a cavidade peritoneal com exsudato, intestino flácido com muco amarelo e sem alimento. Segundo U.S.FDA (1999), *A. hydrophila* pode causar infecções também em humanos pela ingestão de um número suficiente de bastonetes com o alimento ou água. No homem, determina gastroenterite, meningite, úlcera de córnea e, sobretudo, enfermidades respiratória e intestinal.

No Brasil, há poucos trabalhos relacionados com as doenças infecciosas em peixes nativos como o jundiá (*Rhamdia* spp.). Este peixe possui boa aceitação no mercado consumidor, boa produtividade em açudes, e apresenta alto potencial de produção e comercialização, sendo ótima opção para o fomento da piscicultura (RADÚNZ NETO, 1981).

Tendo em vista a expansão mundial da aquicultura, o alto risco de infecções por bactérias patogênicas, e a representatividade e interesse econômico do jundiá é que este trabalho foi realizado, tendo como objetivo avaliar o efeito da inoculação de suspensões de diferentes quantidades de células de *A. hydrophila* em juvenis de jundiá, *R. quelen*.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e no Setor de Piscicultura do Departamento de Zootecnia da Universi-

dade Federal de Santa Maria. Foram utilizados 96 juvenis de jundiás, *R. quelen* QUOY & GAIMARD, 1928, com peso médio de $9,52 \pm 2,75$ g e comprimento médio de $10,87 \pm 0,93$ cm. Utilizaram-se 6 caixas d'água com 250ℓ de capacidade, abastecidas com água de poço artesiano, contendo 16 animais cada uma. Durante o experimento, os parâmetros aquáticos foram os seguintes: temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), oxigênio ($7 \pm 1,6$ mg/ℓ), amônia não ionizada ($0,006 \pm 0,002$ mg/ℓ de NH_3), pH ($7,1 \pm 0,4$), alcalinidade total (36 ± 2 mg/ℓ de CaCO_3) e dureza (24 ± 2 mg/ℓ de CaCO_3).

Depois de ter sido identificada e isolada do rim de um jundiá adulto, segundo método de BARJA & ESTEVES (1988), a bactéria *A. hydrophila* foi utilizada na preparação do inóculo bacteriano. Os inóculos foram preparados com diferentes diluições de cultivos bacterianos em solução salina estéril. Para orientação das concentrações bacterianas, as diluições foram ajustadas pela turvação segundo escala 0,5 e 5 de Mc Farland (VANDEPITTE *et al.*, 1993). Foi aplicado 1ml do inóculo por injeção intramuscular, latero-dorsal direita, em cada peixe do tratamento $1,3 \times 10^9$ (T_3) e $3,5 \times 10^8$ UFC/ml de solução salina (T_2) e, como controle (T_1), 1ml de solução salina a 0,5% em cada peixe. Nos grupos teste, inoculados com bactéria, foram utilizados 32 peixes para cada tratamento (T_2 e T_3), dos quais 24 inoculados com suspensão bacteriana, quatro injetados com solução salina e quatro sem injeções. Estes últimos oito serviam como sentinelas (marcados) para verificar a contaminação por *A. hydrophila* proveniente dos peixes inoculados. No grupo controle (T_1), foram utilizados 28 peixes injetados com solução salina e quatro sem injeções (marcados).

A partir do momento da inoculação, os animais foram observados, para verificação de eventuais manifestações mórbidas ocasionadas pela bactéria em cada grupo de peixes e, dentro de cada grupo, os peixes foram observados individualmente. Também foram feitas observações de alterações comportamentais, morbidade e mortalidade. Os peixes mortos foram utilizados para coletar amostra dos rins e das lesões externas, e realização de reisolamento, contagem e identificação do agente bacteriano. Análise de identificação e contagem bacteriana também foram feitas na amostra de água das caixas, assim como medições dos parâmetros físicos e químicos da água, através de "kit" de análise - ALFA.

A contagem foi feita através de 100μℓ de cada amostra coletada com um alça calibrada, do rim e lesão de cada peixe ou amostra da água em 900μℓ de solução salina e realizadas diluições deci-

mais até 10^8 , com o auxílio de micropipeta e sementes em meio de PCA (Ágar Padrão de Contagem), incubadas a 27°C, por 48 horas, e realizada contagem de cada UFC/ml (BERGEY & HOLT, 1994). Para identificação, as amostras foram semeadas em meio de cultura (AS) Ágar Sangue. Após 48 horas de inoculação a 27°C, os isolados bacterianos foram classificados segundo característica morfológica e tintorial pelo método de Gram. As bactérias gram-negativas foram submetidas ao teste de oxidase e prova bioquímica (BERGEY & HOLT, 1994) para identificação.

Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, sendo a unidade experimental cada um dos 12 peixes de cada caixa das duas repetições. Os parâmetros estimados foram: contagens das UFC no rim e lesão. Utilizando o pacote estatístico SAS (SAS, 1995), foi aplicado teste Tukey com a significância de 5%.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Os jundiás inoculados com *A. hydrophila* apresentaram mortalidade de 100% em 24 horas, incluindo os sentinelas. Nos peixes controles, não houve mortes ou qualquer anormalidade de comportamento. Apesar da *A. hydrophila* fazer parte da microbiota dos peixes (BARJA & ESTEVES, 1988), essa bactéria produz toxina, a acetilcolinesterase, que em grande quantidade é letal segundo RODRIGUEZ *et al.* (1993). Acredita-se então que a causa da mortalidade por *A. hydrophila*, neste ensaio, seja consequência da ação dessas toxinas.

Os sinais clínicos que antecederam a morte dos jundiás infectados foram perda de equilíbrio e movimentos respiratórios mais lentos. NIETO *et al.* (1991) acreditam que essas manifestações sejam resultado dos produtos extracelulares que apresentam efeito narcótico agindo no sistema nervoso central do peixe. No presente trabalho, verificou-se ascite contendo fluido mucoso e amarelado, exoftalmia, úlceras com bordas avermelhadas no local da inoculação, coloração anormal ao longo do corpo, erosão das nadadeiras, lesões irregulares que deixaram a musculatura exposta no poro genital, no ânus e parte externa da maxila inferior, apresentando também brânquias e demais órgãos internos pálidos e flácidos. Os sentinelas que não foram inoculados apresentaram os mesmos sinais clínicos dos inoculados, com exceção das úlceras na região lateral, o que mostra a ação patogênica da bactéria. LLOBRERA & GACUTAN (1987) também observaram úlceras necróticas abertas sobre o corpo, maxilas e na região do pedúnculo caudal em *Ophicephalus striatus*,

Clarias batrachus, *Carassius sp.* e *Glossogobius giurus*. SCHLOTFELDT & ALDERMAN (1995) observaram que a infecção por *A. hydrophila*, além de apresentar os sinais clínicos observados neste estudo, apresentaram também hemorragias necróticas de órgãos internos, principalmente rim e fígado, e deposição de fluido sanguinolento na cavidade abdominal. BARJA & ESTEVES (1988) observaram hemorragia nas brânquias, ao redor do ânus e nos órgãos internos como fígado, baço e rim. Nos jundiás utilizados nesse experimento, não houve hemorragia aparente nas brânquias ou outros órgãos, mas sim lesões ao redor do ânus e poro genital. McDANIEL (1979) relata que a doença pode ocorrer na forma superaguda e aguda, subaguda e crônica. As formas superaguda e aguda são caracterizadas pela alta mortalidade e lesões hemorrágicas internas pronunciadas. As formas subaguda e crônica ocorrem com hemorragias nas brânquias, aberturas naturais, órgãos internos e presença de fluido sanguinolento nas cavidades do corpo; sendo também evidente abscessos e úlceras externas. Quanto aos peixes portadores, o autor os descreve sem manifestação clínica aparente (assintomáticos).

Conforme SCHLOTFELDT & ALDERMAN (1995), em alguns casos de infecção por *A. hydrophila*, os peixes morrem rapidamente, efeito esse que pode variar segundo a resistência dos peixes. SANTOS *et al.* (1991), por inoculações intraperitoneais testaram, durante 7 dias, a DL₅₀ para diferentes espécies de peixe como *Salmo trutta* que foi de aproximadamente de 2×10^5 células/ml, *Anguilla japonica* $>10^8$, *Plecoglossus altivelis* $8,6 \times 10^4$, *Lepomis macrochirus* $>10^8$, *Oncorhynchus mykiss* dependendo das cepas de bactérias variou de $3,2 \times 10^4$ a $>10^8$. Para juvenis de jundiá, este trabalho mostra que as concentrações de 10^9 e 10^8 são letais após 24 horas.

A quantidade média de bactérias que os peixes apresentavam antes da inoculação foi de $3,5 \times 10^2$ UFC/ml no rim e as bactérias encontradas foram: *Aeromonas sp.*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas sp.*, *Vibrio sp.* e *Plesiomonas shigelloides*. Conforme SHAMA *et al.* (2000), o jundiá pode ser portador de bactérias descritas como patogênicas oportunista, tais como *P. shigelloides*, *Aeromonas sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Edwardsiella tarda*, *Yersinia ruckeri*, *Vibrio sp.*, *Micrococcus sp.*, *Acinetobacter sp.* e *Pasteurella sp.* Podendo essas bactérias causar patogenicidade quando os peixes estiverem em condições ambientais adversas. A água das caixas, antes do povoamento com animais, não apresentou nenhum crescimento bacteriano.

Aproximadamente 24 horas após a inoculação, os peixes morreram, e então foi feita a contagem e a identificação das bactérias dos peixes e da água, resultados representados nas tabelas 1 e 2.

Pela análise estatística dos dados das contagens bacterianas dos animais foi verificada diferença significativa entre o rim dos peixes controles (T₁) e dos peixes inoculados do T₂ e T₃. Assim como entre as contagens das UFC do rim e da lesão dentro do mesmo tratamento, e entre as contagens de rim dos inoculados com bactéria bem como entre as lesões destes animais, no mesmo tratamento pelo teste Tukey (P<0,05)(Tabela 1). O fato da quantidade de bactérias encontrada nos rins dos peixes inoculados sempre se mostrar significativamente menor que a encontrada nas lesões do local da inoculação se deve à presença da bactéria na água e, até mesmo, devido à variação do mecanismo de virulência da cepa da bactéria. Segundo RODRÍGUEZ *et al.* (1992), essa variação se dá de acordo com a célula utilizada.

A contagem bacteriana na água, segundo AUSTIN (1980), deve ser inferior a 5 x 10³ UFC/mL, podendo chegar a 5 x 10⁸ UFC/mL, mas o autor se refere ao crescimento de todas as bactérias, o que não é o caso deste trabalho, no qual a quantidade de bactérias chegou a 10⁶ só de *Aeromonas hydrophila* (Tabela 2). A presença das colônias puras deve-se ao fato, possivelmente, aos peixes estarem com alta infecção e eliminarem a bactéria principalmente pelas fezes, o que favoreceu o surgimento de lesões nos poros genitais e ânus; e até mesmo a contamina-

Tabela 2 – Identificação dos grupos de bactérias e resultado médio das contagens bacterianas da água de cultivo dos peixes inoculados após 24 horas.

Água	T ₁ (UFC/mL)	T ₂ (UFC/mL)	T ₃ (UFC/mL)
Contagem	1,6 x 10 ¹	4,8 x 10 ⁵	2,5 x 10 ⁶
Bactérias Identificadas no T ₁ , T ₂ , T ₃	<i>Aeromonas sp</i> <i>Acinetobacter sp</i> <i>Pseudomonas sp</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>

ção dos sentinelas. Isso mostra que os excrementos dos peixes influencia significativamente a microflora aquática. SUGITA *et al.* (1993) observaram que nas amostras de água dos tanques onde foi encontrada *Plesiomonas shigelloides*, essa também foi isolada com alta frequência (80 à 100%), dos intestinos dos peixes.

CONCLUSÃO

As concentrações de 1,3 x 10⁹ e 3,5 x 10⁸UFC de *Aeromonas hydrophila*/mL de solução salina são letais para juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*), quando inoculadas intramuscularmente, nas condições em que foi realizado o presente experimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUSTIN, B. Human disease associated with fish culture. **Journal Bacteriol.** p.190-195, 1980.
- AUSTIN, B., AUSTIN, D.A. **Fish pathogens diseases in farmed and wild.** Chichester, UK : Ellis Horwood., 1987. p. 196-224.

BARJA, J.L., ESTEVES, A.T. **Patologia en Acuicultura.** Espanha : Caicyt. 1988. Enfermidades bacterianas: 550p.

BERGEY, D.H., HOLT, J.G. **Bergey's manual of determinative bacteriology.** Baltimore, Maryland, USA : Copyright, 1994. 350p.

FRERICHS, G.N. Bacterial diseases Of marine fish. **Veterinary Record.** V.125, p.315-318, 1989.

LEWIS, S.D. Research on stress problems associated with harvest, handling and transport of fishes. **Proc. North Central Warmwater Fish Culture-Management Workshop.** Iowa State Univers.: Ames, 1971. Ia., p.21-p.22.

Tabela 1 – Identificação dos grupos de bactérias e resultado médio das contagens bacterianas após 24 horas de inoculação.

Tratamento	Controle (T1)	3,5 x 10 ⁸ UFC/ℓ (T ₂)		1,3 x 10 ⁹ UFC/ℓ (T ₃)	
	UFC/mL	Rim	Lesão	Rim	Lesão
Inoculados	3,7 x 10 ^{2a}	1,9 x 10 ^{7b}	9,3 x 10 ^{8c}	5,4 x 10 ^{8d}	8,7 x 10 ^{9e}
Sentinelas inoculadas	4,6 x 10 ²	1,4 x 10 ⁶	3,9 x 10 ⁸	4,9 x 10 ⁶	4,1 x 10 ⁹
Com solução salina					
Sentinelas sem inocular	2,5 x 10 ²	8,6 x 10 ⁴	2,1 x 10 ⁶	1,9 x 10 ⁶	5,3 x 10 ⁸
Bactérias Identificadas No T ₁ , T ₂ , T ₃	<i>Aeromonas sp.</i> <i>Acinetobacter sp.</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Vibrio sp.</i> <i>Plesiomonas sp.</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>		<i>Aeromonas hydrophila</i>	

a, b, c, d, e Médias na linha, seguidas de letras desiguais, diferem entre si pelo teste de Tukey

- LEWIS, D.H., PLUMB, J.A. **Bacterial disease. Principal diseases of farm-raised catfish.** Auburn : Souther Coop. Ser. Alabama Agriculture Exp. Stn, 1979. p.115-124.
- LLOBRERA, A.T., GACUTAN, R.Q. *Aeromonas hydrophila* associated with ulcerative disease epizootic in Laguna de Bay, Philippines. **Aquaculture**, v.7, p.273-278, 1987.
- McDANIEL, D. **American Fisheries Society: Fish Health Section.** Washington : Copyright, 1979. Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens: 118p.
- NIETO, T.P., SANTOS, Y., RODRÍGUEZ, L.A., *et al.* An extracellular acetylcholinesterase produced by *Aeromonas hydrophila* is a major lethal toxin for fish. **Microbial Pathogenesis**. v.11, p.101-110, 1991.
- PLUMB, J.A. **Health maintenance of cultured fishes.** Principal microbial diseases. USA : CRC, 1994. 254p.
- RADÜNZ NETO, J. **Desenvolvimento de técnicas de reprodução e manejo de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*).** Santa Maria – RS, 1981. 77p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, 1981.
- RALL, V.L.M., ARIAS, S.T., HEIDTMANN, S., *et al.* *Aeromonas* species isolated from pintado fish (*Pseudoplatystoma sp*): Virulence factors and drug susceptibility. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.29, p.222-227, 1998.
- RICHARDS, R.H., ROBERTS, R.J. The bacteriology of teleosts. In: ROBERTS, R.J. **Fish pathology.** London : Baillien Tindall, 1978. Cap.8, p.183-204.
- RODRÍGUEZ, L.A., ELLIS, A.E., NIETO, T.P. Purification and characterisation of the extracellular metalloprotease, serineprotease and haemolysin of *Aeromonas hydrophila* strain B₃₂: all are lethal for fish. **Microbial Pathogenesis**. v.14, p.10-18, 1992.
- RODRÍGUEZ, L.A., FERNANDEZ, A.I.G., NIETO, T.P. Production of the lethal acetylcholinesterase toxin by different *Aeromonas hydrophila* strain. **Journal of Fish Diseases**. v.16, p.73-78, 1993.
- SANTOS, Y., BANDÍN, I., NIETO, T.P., *et al.* Cell-surface-associated properties of fish pathogenic bacteria. **Journal of Aquatic Animal Health**, Scotland, v.3, p.297-301, 1991.
- SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM) Institute, SAS / STAT. **User's guide: statistics.** 4 ed. Cary, North Carolina : versão 6.08, 1995. 846p.
- SHAMA, S., BRANDÃO, D.A., VARGAS, A.C., *et al.* Ocorrência de bactérias com potencial patogênico em jundiás (*Rhamdia quelen*) cultivados em sistema semi-intensivo. **Ciência Rural**, v.30, n.2, p.293-298, 2000.
- SCHLOTTFELDT, H.J., ALDERMAN, D.J.A. Practical guide for the fresh water fish farmer. **Bulletin European Association of Fish Pathologists**. Weymouth - UK, v.15, n.4, p.134-157, 1995.
- SUGITA, H., NAKAMURA, T., DEGUSHI, Y. Identification of *Plesiomonas shigelloides* isolated from fresh water fish with the microplate hybridization method. **Journal of Food Protection**, v.56, p.949-953, 1993.
- THUNE, R.L., STANLEY, L.A., COOPER, R.K. Pathogenesis of gram-negative bacterial infections in warmwater fish. **Annual Rev of Fish Diseases**. v.3, p.37-68, 1993.
- U. S. FDA (FOOD & DRUG ADMINISTRATION). Center for Food Safety & Applied Nutrition (CFSAN). **Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook.** www.fda.gov/homepage. p.1-3, 1999.
- VANDEPITTE, J., ENGBAEK, K., PIOT, P., *et al.* **Métodos básicos de laboratório em bacteriologia clínica.** Genebra: Organização Mundial de Saúde, 1993. 122p.
- WALTERS, G.R., PLUMB, J.A. Environmental stress and bacterial infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. **J Fish Biol**. v.17, p.177-185, 1980.