

AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS SANGUÍNEOS E SOBREVIVÊNCIA DO TAMBAQUI, *Colossoma macropomum* INFECTADOS POR *Aeromonas hydrophila*

Jhonatan Mota da SILVA¹
Jaqueline Inês Alves de ANDRADE²
Elizabeth Gusmão AFFONSO¹

¹Instituto Nacional Pesquisa da Amazônia – INPA; ²Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

INTRODUÇÃO

O tambaqui, *Colossoma macropomum*, é uma espécie que apresenta várias características favoráveis para a produção, como domínio do processo reprodutivo, rusticidade, alta produtividade, grande aceitação pelo mercado consumidor e um alto valor comercial (Kubitza *et al.* 2012). Atualmente é a espécie nativa mais produzida na região Norte e a segunda em todo o Brasil, com cerca de 111.084,1 t em 2011 (MPA 2013).

Com a intensificação na sua produção, a ocorrência de doenças nos locais de cultivo passou a ser um dos grandes problemas para os piscicultores. Isso é uma consequência de vários fatores, tais como manejo inadequado, má alimentação, qualidade da água inadequada, etc., que pode contribuir para o aparecimento de doenças causadas por patógenos, principalmente bactérias oportunistas, como a espécie *Aeromonas hydrophila* (Pavanelli *et al.* 2008). Essas são bacilos ou coco-bacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos, não esporulantes, e considerada uma das principais causas de perdas nos sistemas de criação (Pavanelli *et al.* 2008). O mecanismo de virulência dessa bactéria é uma enterotoxina citotóxica capaz de lisar eritrócitos e causar danos irreversíveis nas membranas celulares, hemorragias, lesões no epitélio, degeneração das células renais e indução no acúmulo de fluido no intestino de peixes (Costa 2005).

Em geral, os efeitos das bacterioses induzem estresse nos peixes que respondem com alterações fisiológicas no organismo (Tavares-Dias e Moraes 2007), sendo os parâmetros sanguíneos uma importante ferramenta nesta avaliação em peixes (Ranzani-Paiva *et al.* 1999). Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi definir a tolerância de juvenis de tambaqui a diferentes concentrações da *A. hydrophila* e avaliar as respostas fisiológicas dos peixes sob efeito da infecção.

MATERIAL E MÉTODOS

Os peixes foram adquiridos de piscicultores locais, e transferidos para a estação de piscicultura da Coordenação de Pesquisa em Tecnologia e Inovação – COTI, do Instituto Nacional Pesquisa da Amazônia-INPA. Em seguida foram mantidos em um tanque escavado de 150 m², alimentados diariamente, com ração comercial contendo 36% de proteína bruta, até atingirem o peso médio de 29,7 ± 2,8 g.

A espécie *A. hydrophila* foi adquirida da coleção de cultura do Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos (LAPOA), do Centro de Aquicultura da Universidade do Estado de São Paulo, CAUNESP, em Jaboticabal-SP. Foram utilizados 150 peixes, distribuídos em 15 grupos de 10 peixes em cada, divididos em quatro concentrações bacterianas (4,2 x 10⁶, 4,2 x 10⁷, 4,2 x 10⁸, 4,2 x 10⁹) e um controle (solução salina estéril 0,85%), em aquários de 80 L, sistema fechado, por 96 horas, em triplicata. Para o teste, a bactéria foi cultivada em meio de cultura Ágar Mueller-Hinton, 24 h antes da inoculação. Após esse período, foi preparada uma suspensão bacteriana, utilizando solução salina estéril 0,85%, e as células bacterianas foram contadas em câmara de Neubauer. Após isso, foram realizadas diluições das suspensões bacterianas até as concentrações desejadas, e, em seguida, 100 µL foram inoculados, por via intraperitoneal, nos peixes. Durante toda a realização do teste, foi observada a mortalidade e o comportamento dos peixes e avaliadas as variáveis físicas e químicas da água.

Amostras de sangue foram coletadas por meio da punção do vaso caudal, utilizando seringas com EDTA 10%, e destinadas à determinação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos. Com o sangue total, foi determinado: hematócrito (Ht), com o uso de tubo capilar e centrifuga de microhematócrito, contagem de eritrócitos, pela câmara de Neubauer, após diluição em solução de Natt e Herrick (1952), concentração de hemoglobina ([Hb]), pelo método da cianometahemoglobina, utilizando um kit comercial. Os índices hematimétricos - volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM), foram calculados a partir dos valores de Ht, número de eritrócitos e [Hb]. O plasma sanguíneo, obtido por centrifugação do sangue total, foi destinado a: glicose plasmática (mg/dL), proteínas totais (mg/dL) e colesterol (mg/dL) por método colorimétrico, em espectrofotômetro, utilizando kit comercial.

As análises dos parâmetros de qualidade de água foram realizadas durante todo o período experimental. Oxigênio dissolvido, temperatura e condutividade elétrica, utilizando um oxímetro digital da marca (YSI, 85), e o pH num pHmetro digital da marca (YSI, 60). A amônia total foi determinada pelo método descrito por Verdouw *et al.* (1978), e nitrito, segundo Boyd e Tucker (1992). Alcalinidade, dureza e CO₂ foram determinadas pelo método de titulação.

As variáveis de qualidade de água e o peso dos animais foram submetidos à análise de variância ANOVA one-way ($p < 0,05$). Quando houve diferença significativa entre os tratamentos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Os parâmetros sanguíneos foram submetidos ao Test T de Student. Todos os valores foram apresentados como média \pm desvio padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Mudanças na qualidade da água podem afetar a homeostase dos peixes e, conseqüentemente, alterar suas respostas fisiológicas (Baldisserotto 2009). Assim, o monitoramento das variáveis físicas e químicas da água é necessário durante a realização de bioensaios, principalmente aqueles que podem alterar a qualidade da água, e os resultados dos testes. No presente estudo, não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre o controle e o tratamento com $4,2 \times 10^6$ UFC, exceto a condutividade elétrica que apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) no tratamento em relação ao controle (Tabela 1). Os valores encontrados nas variáveis físicas e químicas da água analisados estão dentro da faixa de conforto para peixes tropicais (Kubtiza 2003) e para esta espécie (Almeida-Val *et al.* 1993; Costa *et al.* 2004; Marcon *et al.* 2004; Aride *et al.* 2007). A causa da alteração nos valores de condutividade elétrica, e do valor elevado de amônia obtidos no presente estudo foi provavelmente devido à perda de metabolitos dos peixes para a água. Isso foi decorrente da eliminação de fezes, uma vez que os peixes foram mantidos em sistema estático, sem troca de água durante todo o experimento (96 h).

Durante o período experimental (96 h), todos os peixes do controle e da concentração de $4,2 \times 10^6$ sobreviveram, entretanto, nas demais concentrações, 100% dos animais morreram. O tempo de mortalidade foi proporcional ao aumento das concentrações de bactéria, pois, em 24, 12 e 9 h de inoculação, não havia sobreviventes nos tratamentos com $4,2 \times 10^7$, $4,2 \times 10^8$ e $4,2 \times 10^9$ respectivamente. A mortalidade dos peixes está relacionada a vários fatores, como: tamanho dos animais, espécie, estado nutricional, qualidade da água e grau de virulência do patógeno (Oliveira *et al.* 2011). Por isso, é descrito na literatura divergências entre o nível de tolerância e as respostas fisiológicas de diferentes espécies de peixes (Garcia e Moraes 2009).

Os peixes de todas as concentrações apresentaram sinais clínicos característicos de infecção por *A. hydrophila*, tais como: natação errática, hemorragia ao longo do corpo, erosão das nadadeiras, acúmulo de líquido na cavidade intraperitoneal, fígado friável. Outras espécies de peixes, incluindo o tambaqui, quando acometidos por infecção causada por *A. hydrophila*, apresentaram sintomatologia semelhante (Chagas *et al.* 2013).

Os estudos dos parâmetros sanguíneos dos organismos aquáticos, incluindo os peixes, são importantes ferramentas para avaliar o estado de saúde desses animais (Affonso *et al.* 2002). No presente trabalho, foram analisados os parâmetros fisiológicos somente do controle e do tratamento com $4,2 \times 10^6$, uma vez que, nas demais concentrações, não houve sobreviventes. Os resultados dos parâmetros sanguíneos analisados dos peixes do controle e do tratamento ($4,2 \times 10^6$ UFC/mL) não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) (Tabela 2). Resultados semelhantes foram obtidos para outras espécies de peixes. Das *et al.* (2011), avaliando *Puntius sarana*, não encontraram diferenças nos valores de proteínas totais, [Hb], número de eritrócitos e glicose desta espécie após 4 dias de infecção por *A. hydrophila*. Silva *et al.* (2010) observaram resultados semelhantes para o pirarucu, *Arapaima gigas*. Porém, Garcia e Moraes (2009) observaram uma diminuição no nível de proteína total, aliado a um quadro de anemia em pacu, *Piaractus mesopotamicus*, após 24 horas de infecção por *A. hydrophila*.

Entretanto, para tambaquis infectados com $4,2 \times 10^6$ UFC/mL, os resultados demonstraram que, além da sobrevivência de todos os peixes, a manutenção da homeostase, durante o período experimental, são importantes indicadores para futuros experimentos utilizando a *A. hydrophila* nos testes de desafios.

Tabela 1. Variáveis físicas e químicas da água dos aquários com tambaquis infectados por *A. hydrophila*. OD = Oxigênio dissolvido, T(°C) = Temperatura, CE = Condutividade elétrica, Al = Alcalinidade, DU = Dureza, AT = Amônia total. Média ± Desvio padrão.

Variáveis físicas e químicas da água	Concentrações bacterianas (UFC/mL)	
	Controle	4,2 x 10 ⁶
OD (mg/L)	7,32 ± 0,01	7,31 ± 0,17
T (°C)	25,67 ± 0,31	26,0 ± 0,00
pH	7,19 ± 0,09	7,13 ± 0,02
CE (µS/cm ⁻³)	37,83 ± 1,26 a	39,67 ± 0,58 b
Al (mg CaCO ₃ /L)	11,73 ± 1,95	11,92 ± 1,36
DU (mg CaCO ₃ /L)	2,42 ± 0,52	2,59 ± 0,14
AT (mg/L)	2,94 ± 0,26	3,17 ± 0,11
Nitrito (mg/L)	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
CO ₂ (mg/dL)	10,0 ± 0,00	10,0 ± 0,00

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os tratamentos.

Tabela 2. Parâmetros sanguíneos dos tambaquis, *Colossoma macropomum*, após 96 h de inoculação intraperitoneal de *A. hydrophila*. VCM = Volume corpuscular médio, CHCM = Concentração de hemoglobina corpuscular média e HCM = Hemoglobina corpuscular média. Valores são média ± desvio padrão.

Parâmetros Sanguíneos	Concentrações bacterianas (UFC/mL)	
	Controle	4,2 x 10 ⁶
Hemoglobina (g/dL)	9,75 ± 1,40	10,11 ± 1,34
Hematócrito (%)	23,39 ± 3,92	24,86 ± 3,66
RBC (milhões/µL)	1,43 ± 0,20	1,51 ± 0,26
VCM (fL)	163,71 ± 16,41	165,91 ± 18,70
CHCM (g/dL)	42,02 ± 2,70	40,81 ± 2,66
HCM (pg)	68,53 ± 5,67	67,63 ± 8,14
Glicose (mg/dL)	31,57 ± 12,03	35,80 ± 11,24
Proteínas Totais (g/dL)	2,21 ± 0,41	2,25 ± 0,56
Colesterol (mg/dL)	76,24 ± 16,01	77,42 ± 11,81

CONCLUSÃO

A infecção por *A. hydrophila* acima de 4,2 x 10⁶ UFC/mL, para tambaquis com peso médio de 29,7±2,8 g, não é indicada para testes de desafio com esta bactéria, pois houve 100% de mortalidade. A concentração com 4,2 x 10⁶ UFC/mL, além de manter 100% dos peixes vivos, não alterou a homeostase fisiológica dos peixes. Portanto, para estudos de desafio, esta concentração de *A. hydrophila* pode ser indicada.

REFERÊNCIAS

- Affonso, E.G.; Polezb, V.L.P.; Corrêa, C.F.; Mazon, A.F.; Araújo M.R.R.; Moraes, G.; Rantin, F.T. Rantin. 2002. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C 133: 375–382.
- Almeida-Val, V.M.; Val, A.L.; Hochachka, P.W. 1993. Hypoxia tolerance in Amazon fishes: Status of an under-explored biological "goldmine". In: P.W. Hochachka; P.L. Lutz; T. Sick; M. Aride, P.H.R.; Roubach, R.; Val, A.L. 2007. Tolerance response of tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier) to water pH. *Aquaculture Research*, 38: 588-594.
- Baldisserotto, B. 2009. *Fisiologia de Peixes Aplicada à Piscicultura*. 2ª Ed, Editora ISBN, 352p.
- Boyd, C.E.; Tucker, C.S. 1992. *Water Quality and Pond Soil Analyses for Aquaculture*. Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, Alabama, 183 p.
- Chagas, E.C.; Pilarski, F.; Sakabe, R.; Moraes, F.R. 2013. Desempenho produtivo e respostas fisiopatológicas de tambaquis alimentados com ração suplementada com β- glucano. *Pesq. agropec. Brás.*, 48(8): 899-905.
- Costa, O.T.F.; Ferreira, D.J.S.; Mendonça, F.P.; Fernandes, M.N. 2004. Susceptibility of Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalminae) to short-term exposure to nitrite. *Aquaculture*, 232: 627-636.

- Costa, A.B. 2005. *Características de bactérias do complexo Aeromonas isoladas de peixes de água doce e sua atividade patológica*. Tese doutorado, Escola Superior de Agricultura/ Universidade de São Paulo. Estado de São Paulo. 54p.
- Das, A.; Sahoo, P.K.; Mohant, B.R. 2011. Pathophysiology of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in *Puntius sarana*: Early changes in blood and aspects of the innate immune-related gene expression in survivors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, (142): 207– 218.
- Garcia, F.; Moraes F, R. 2009. Hematologia e sinais clínicos de *Piaractus mesopotamicus* infectados experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 31(1): 17-21.
- Kubitza, F. 2003. *Qualidade da água no cultivo de peixes e camarões*. Jundiaí, São Paulo. 229p.
- Kubitza, F.; Campos, J.L.; Ono, E.A. Istchuk, P.E. 2012a. Panorama da Piscicultura no Brasil (Parte I). Estatísticas, espécies, pólos de produção e fatores limitantes à expansão da atividade. *Panorama da Aquicultura*. 132: 14-25.
- Marcon, J.L.; Moreira, S.S.; Fim, J.D.I. 2004. Median lethal concentration (LC50) for un-ionized ammonia in two Amazonian fish species, *Colossoma macropomum* and *Astronotus ocellatus*. In: VI International Congress on the Biology of Fish. Manaus. 1: 105-116.
- MPA. 2013. Ministério da Pesca e Aquicultura. *Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura Brasil 2011*. 60p.
- Natt, M.P.; Herrick, C.A. 1952. A new blood diluent for counting erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poultry Science*, 31: 735-738.
- Oliveira, S.R.; Souza, R.T.Y.B.; Brasil, E.M.B.; Andrade, J.I.A.; Nunes, É.S.S.; Ono, E.A.; Affonso, E.G. 2011. LD50 of the bacteria *Aeromonas hydrophila* to matrinxã, *Brycon amazonicus*. *Acta Amazonica*, 41(2): 321-326.
- Pavanelli, G.C.; Eiras J.C.; Takemoto, R.M. 2008. *Doenças de peixes. Profilaxia, diagnóstico e tratamento*. Editora Universidade Estadual de Maringá. 305p.
- Ranzani-Paiva, M. J.T.; Salles, F.A.; Eiras, J.C.; Eiras, A.C.; Ishikawa, C.M.; Alexandrino, A.C. 1999. *Análises hematológicas de curimatá (Prochilodus scrofa), pacu (Piaractus mesopotamicus) e tambaqui (Colossoma macropomum) das Estações de Piscicultura do Instituto de Pesca, Estado de São Paulo*. Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo, 25 (único): 77 – 83.
- Silva, A.M.D.; Brasil, E.M.; Affonso, E.G. 2010. Avaliação hematológica de juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas*, infectados pela bactéria *Aeromonas hydrophila*. E. Ciências Agrárias - 4. Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca - 1. Aquicultura, 62ª Reunião Anual da SBPC, 25 a 30 de julho de 2010, Natal RN.
- Tavares-Dias, M.; Moraes, F.R. 2007. Leukocyte and thrombocyte reference values catfish (*Ictalurus punctatus* Raf), with an assessment of morphologic, cytochemical, and ultrastructural features. *Veterinary Clinical Pathology*, Madison, 36: 49-54.
- Verdouw, H.; Van Eched, C.J.A.; Dekkers, E.M. J.1978. Ammonia determination based on indophenols formation with sodium silicylate. *Waterresearch*, 12(6): 397-402.