

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

**FUNGICIDAS NO CONTROLE DE *Aphanomyces* sp. E SEUS FEITOS TÓXICOS
NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO *Danio rerio***

Karen de Souza Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Tachibana
Co-orientadora: Dra. Cíntia Badaró-Pedroso

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca - APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

São Paulo
Fevereiro – 2018

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

**FUNGICIDAS NO CONTROLE DE *Aphanomyces* sp. E SEUS FEITOS TÓXICOS
NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO *Danio rerio***

Karen de Souza Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Tachibana
Co-orientadora: Dra. Cíntia Badaró-Pedroso

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca - APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

São Paulo
Fevereiro – 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Elaborada pelo Núcleo de Informação e Documentação. Instituto de Pesca, São Paulo

F383f

Ferreira, Karen de Souza

Fungicidas no controle de *Aphanomyces* sp. e seus efeitos tóxicos no desenvolvimento embrionário do *Danio rerio* / Karen de Souza Ferreira. -- São Paulo, 2018.

v, 43f. ; il. ; graf. ; tab.

Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - Secretaria de Agricultura e Abastecimento.

Orientador: Leonardo Tachibana

1. Oomiceto. 2. Efeito tóxico letal e subletal. 3. Sanidade. 4. Tratamento químico. 5. Peixe-zebra. I. Tachibana, Leonardo. II. Título.

CDD 639.93

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

“Fungicidas no controle de *Aphanomyces* sp. e seus feitos tóxicos no desenvolvimento embrionário do *Danio rerio*”

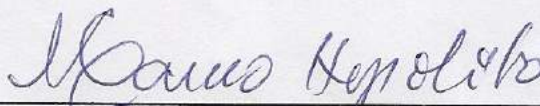
AUTORA: Karen de Souza Ferreira

ORIENTADOR: Leonardo Tachibana

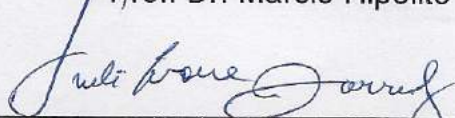
Aprovada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM AQUICULTURA E PESCA, Área de Concentração em Aquicultura, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. Leonardo Tachibana



Prof. Dr. Márcio Hipólito



Profª Drª Sueli Ivone Borrely

Data da realização: 07 de fevereiro de 2018



Presidente da Comissão Examinadora
Profª. Drª Katharina Eichbaum Esteves

“TUDO É OUSADO PARA QUEM NADA SE ATREVE”.

Fernando Pessoa

Dedico a minha amada família, amigos, companheiras de bancada e todos aqueles que, de alguma maneira, contribuíram com este trabalho.

***FUNGICIDAS NO CONTROLE
DE *Aphanomyces* sp. E SEUS
EFEITOS TÓXICOS NO
DESENVOLVIMENTO
EMBRIONÁRIO DO *Danio rerio****

Agradecimentos

SOU GRATA...

Ao meu orientador Dr. Leonardo Tachibana e a minha co-orientadora Dra. Cíntia Badaró Pedroso por ter dado a oportunidade de trabalhar, pelos ensinamentos, amizade e confiança durante todo este período.

À Dra. Cláudia Maris por fazer parte deste projeto, além dos ensinamentos e o apoio.

As minhas companheiras de bancada e amigas Débora Colombo e Fernanda Ikari que me ajudaram nos experimentos deste projeto, pela amizade e por não me deixarem desesperar se não saiam as coisas da forma que eu imaginava.

Aos bolsistas PIBICs Aline Viana, Beatriz Prata, Desyrée Yumiko e Ruan Carneiro que sempre me deram apoio no laboratório.

Aos mestrandos Isabela Moia, Danilo Pereira, Victor Spandri, Marcelo Horikoshi, André Resende e Thiago Dal Negro que estavam sempre prontos a me ouvir, ajudar e oferecer um copo de “tônico revigorante”.

Aos amigos que fiz dentro do programa: Tais Lima, Veronica Takatsuka, Gabriela Bergamo, Otávio Mesquita, Naiara Yoshimini, Cintia Garcia, Ana Paula Santos, Felipe von Atzingen, Julia Domingos, Lilian Pereira, Sthefani Rosa, Katia Cristina Aparecido, Diego Sales, Ednara Rosine, Francine Côa, Willian Reina e Jéssica Knoeller por tudo, pelas risadas, pelos ombros amigos e principalmente força para continuar.

As TT's Iara Simões e Maressa Costa pelas palavras amigas ou apoio nas loucuras.

Aos Pós-Doutorandos do Instituto, Eduardo Malavasi e Sílvia Patrícia Carraschi pelos toques e técnicas.

Ao Instituto de Pesca APTA-SAA, pela infra-estrutura para execução deste trabalho, aos pesquisadores e corpo técnico.

Ao Programa de Pós-graduação e a todos os professores que ministraram as disciplinas que cursei que contribuíram para minha formação profissional.

Aos técnicos Ocimar Pedro e Angela Trindade, por todo o apoio e palavra amiga nas horas de angústia.

À Pesquisadora Dra. Letícia Petesse pela paciência em ensinar estatística de uma forma maravilhosa e por me acalmar quando não encontrava mais respostas.

À Professora Dra. Carmen Pires-Zottarelli e a Mestre Sarah Rocha do Instituto de Botânica – SMA/SP por me receberem no laboratório Micologia, para identificação do meu material. Obrigada pela parceria e sugestões com a dissertação.

À Professora Dra. Eliane Vieira do Instituto Biológico APTA-SAA pelas contribuições na banca de qualificação e análise químicas das soluções deste projeto.

À Mestre Rebeca Fabbro e ao Instituto de Química da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, pela recepção e pelas análises químicas dos produtos.

À Pesquisadora Dra. Yara Aiko Tabata da APTA Regional/SAA pelo incentivo e fornecimento de produtos para laboratório.

À Dra. Sueli Borrely e Dr. Márcio Hipólito pela participação na minha banca de defesa e sugestões.

Aos Dr. Vander Bruno, Dr. Carlos Ishikawa, Dra. Maria José Ranzani-Paiva pelas sugestões no artigo.

Aos amigos que nunca me deixam desistir e me deixam alegre nas horas mais difíceis, em especial a Letícia Moraes, Marcel Pires, Mariana Sakae, Beatriz Reis, Aline Vieira, Ana Paula Pedrassi, Mariana Villas Boas, Caio Ribeiro, Mariana Santos, Suzana Kotzent, Alexandre Rodrigues e Natasha Anasawa.

Aos Professores Drs. Martha Godinho, Flávio Jotta e Leandro Carmo do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo por toda a ajuda no estágio docência e aos amigos e colegas que fiz no IFSP em especial Mariana Cremom, Kyriã Esperidião e tantos outros...

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa DS concedida.

E principalmente a minha família: Ana Lúcia de Souza, Karoline Ferreira e Fernando Anacleto Jr. pelo amor, compreensão e principalmente por sempre acreditarem em mim. Vocês são o motivo de nunca desistir dos meus sonhos e vocês são o sentido da minha vida!

OBRIGADA!!!

Sumário

| | |
|---|----|
| AGRADECIMENTOS | I |
| SUMÁRIO | IV |
| INTRODUÇÃO GERAL | 1 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 9 |
| CAPÍTULO ÚNICO | 13 |
| RESUMO..... | 14 |
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 17 |
| 2.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO PATÓGENO | 17 |
| 2.2. MANUTENÇÃO DOS ORGANISMOS TESTES | 18 |
| 2.3. TESTES <i>IN VITRO</i> | 19 |
| 2.3.1. ENSAIO CONCENTRAÇÃO DE INIBIÇÃO | 19 |
| 2.3.2. ENSAIO CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA..... | 20 |
| 2.4. TESTES <i>IN VIVO</i> | 21 |
| 2.5. VALIDAÇÃO DOS ENSAIOS | 23 |
| 2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA | 24 |
| 3.2. TOXICIDADE: <i>APHANOMYCES</i> SP. | 26 |
| 3.3. TOXICIDADE: <i>DANIO RERIO</i> | 30 |
| 4 DISCUSSÃO | 33 |
| 5 CONCLUSÕES | 36 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 37 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 43 |

Introdução geral

A piscicultura continental tem papel de destaque no agronegócio mundial e, atualmente vem aumentando a sua importância em âmbito nacional (LUVIZOTTO-SANTOS *et al.*, 2009). Em 2015, foram produzidas 483 mil toneladas de peixes no país (BRASIL, 2017) e, com a perspectiva da população mundial alcançar mais de 9 bilhões de pessoas em 2050, a FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, ressalta a necessidade da produção de alimentos, principalmente proteína animal, fator principal para que não haja subnutrição mundial. A aquicultura será fornecedora de proteína, pois a captura por pesca vem declinando nas últimas décadas, devido a sobrepesca e a degradação ambiental. As expectativas indicam que a aquicultura no Brasil terá crescimento superior a 104% até 2025 (FAO, 2016).

O sucesso na piscicultura está intrinsicamente ligado à implementação de boas práticas de manejo nos viveiros como também em condições laboratoriais, como o controle da qualidade da água, quarentena dos organismos antes da entrada no sistema, profilaxia dos tanques, aquários e dos animais, retirada de peixes doentes e alimentação balanceada e de qualidade (HILL *et al.*, 2005; TAVECHIO *et al.*, 2009; ADU and THOMSEN 2011).

Estes fatores são preponderantes para o controle de diversas patologias, e a não conformidade de algum deles deixa uma abertura para os patógenos oportunistas como as bactérias, vírus, parasitas e oomicetos (FIGUEIREDO e LEAL, 2008; VALLADÃO *et al.*, 2015).

Caracterização da patologia

As dermatomicoses são mais frequentes em peixes em temperaturas mais baixas, principalmente no período de inverno em regiões tropicais e subtropicais. A transmissão dos microrganismos patogênicos ocorre pela água ou pelo contato peixe a peixe. (PAVANELLI *et al.*, 2002; PRADHAN *et al.*, 2008).

Infecções causadas por oomicetos são comumente atribuídas aos gêneros *Saprolegnia* e *Achlya*, porém, outros oomicetos também podem parasitar outros organismos. Espécies de *Aphanomyces* são mais

conhecidas como parasitas de plantas ou de invertebrados (DIÉGUEZ-URIBEONDO et al. 2009).

Caracterização do patógeno

Segundo KIRK *et al.* (2008) os oomicetos estão presentes em todos os ecossistemas, aquáticos, marinho, continentais e terrestres, podendo ser sapróbios obrigatórios ou parasitas facultativos de macroalgas, peixes, fases larvais de insetos, plantas ou raízes, mamíferos, até mesmo o ser humano. São organismos unicelulares, com talo holocárpico, ou micelial, eucárpico e hifas cenocíticas. A reprodução assexuada ocorre pela formação de zoósporos biflagelados e, a sexuada, pelo contato de gametângios diferenciados (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996).

O oomiceto *Aphanomyces invadans* é agente etiológico das enfermidades granulomatose micótica, doença das manchas vermelhas, micose ulcerativa e a síndrome ulcerativa epizoótica, que posteriormente identificou-se como a mesma doença e propuseram um novo nome - aphanomicose granulomatosa epizoótica (BALDOCK *et al.*, 2005). Segundo TAKUMA *et al.* (2013), esta unificação corroborou com os relatórios de notificação da enfermidade. O gênero *Aphanomyces* foi criado para agrupar espécies que possuem hifas consideradas mais delicadas e delgadas (Figura 1) em relação a outros oomicetos (SCOTT, 1961).



Figura 1: Hifas de *Aphanomyces* sp. crescendo água com sementes de *sorghum* sp.

Produtos químicos

De acordo com ANDRADE *et al.* (2005) a chegada do inverno propicia surtos de doenças e fungos em peixes, tanto de aquários, quanto de piscicultura e vários métodos são utilizados para evitar ou, até mesmo, tratar os organismos, sendo que vários destes produtos são altamente tóxicos se administrados de maneira incorreta.

LUVIZOTTO-SANTOS *et al.* (2009) ressaltaram a importância de conhecer os produtos utilizados na aquicultura, mesmo os sem registro para a atividade, para se manter a segurança alimentar, ambiental e laboral da produção aquícola no país.

Verde de malaquita foi o produto mais utilizado no tratamento de patologias causadas por oomicetos. Em 2005 foi totalmente proibido o seu uso na aquicultura após o reconhecimento da sua alta toxicidade para o organismo tratado e para o ambiente, além do potencial carcinogênico, teratogênico e mutagênico (OONO *et al.*, 2007; SUDOVA *et al.*, 2007).

Outro produto muito utilizado é o formol para tratamento de ovos, mas, tem sido substituído gradativamente por outros de menor impacto nos ecossistemas e de menor toxicidade, como o cloreto de sódio, permanganato de potássio, iodeto de polivinilpirrolidona, óleos essenciais e extratos de plantas, aliado às melhorias nas práticas de manejo dos sistemas (FUANGSAWAT *et al.*, 2011; CORRÊA *et al.*, 2013; VALLADÃO *et al.*, 2015).

Segundo OONO and HATAI (2008) o bronopol surgiu como alternativa no Japão para tratamento de ovos de trutas contra oomicetos, devido a sua utilização anterior em produtos cosméticos e produtos farmacêuticos.

No Brasil, o bronopol é utilizado também para conservação de leite (LASMAR *et al.*; 2011). O bronopol é um composto bastante solúvel em água, por isso nos ecossistemas não se espera que seja bioacumulado e ainda é uma substância de baixa toxicidade. É um composto instável no ambiente e, por isso, é degradado rapidamente ou está presente em baixas concentrações (DYE *et al.*; 2007).

Para ALI *et al.* (2015) o bronopol não tem a mesma eficácia do verde de malaquita, porém, a sua toxicidade é baixa para peixes e seus ovos, a

segurança alimentar é a principal vantagem do produto. No entanto, foi demonstrado posteriormente efeitos crônicos em fito e zooplâncton.

O sulfato de cobre, amplamente utilizado na aquicultura para combater parasitas e algas em tanques ou corpos hídricos, sendo que a sua eficácia tem sido reconhecida contra micoses causadas por oomicetos e, também é utilizado para controle do parasita *Ichthyophthirius multifiliis* (NOGA and DYKSTRA, 1986; BOYD and TUCKER, 1998; SUN *et al.*, 2014; MELENDRE *et al.*, 2006). O sulfato de cobre também é utilizado como substância de referência em ensaios ecotoxicológico (VENTURINI *et al.*, 2008; ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008; PAIXÃO *et al.*, 2013).

O azul de metileno é um dos produtos para tratamento mais utilizados para peixes de aquário, no combate aos fungos e protozoários externos. Ele possui a vantagem de ser pouco tóxico em relação a outros produtos tanto em banho de curta como de longa duração. Este fármaco pode ocasionar, dependendo da concentração, aumento da ventilação respiratória branquial dos peixes devido à transformação da metahemoglobina sanguínea em hemoglobina, portanto, é muito útil em casos de opacidade contagiosa da pele e brânquias, onde ocorre insuficiência respiratória (PAVANELLI *et al.* 2002, ANDRADE *et al.* 2005).

Entre os banhos mais utilizados na profilaxia de peixes, estão o banho com cloreto de sódio (NaCl), permanganato de potássio (KMnO₄), formalina, azul de metileno, e com cloranfenicol; todos esses são utilizados na profilaxia e têm sido estudados para o tratamento de doenças provocadas por fungos, vírus e bactérias (ANDRADE *et al.*, 2005).

Atualmente, existe a preocupação tanto dos profissionais que atuam na área quanto do consumidor em adquirir um produto, no caso, o peixe, isento de contaminações. É por este motivo que se deve reservar especial atenção ao prazo de carência de cada produto no organismo após tratamento (MARTINS, 2004).

CARRASCHI *et al.* (2015) ressaltam a necessidade de ensaios para avaliação da toxicidade das substâncias utilizadas em ovos e peixes.

A sensibilidade à alguns agentes químicos varia entre espécies de peixes, portanto, há uma grande demanda no desenvolvimento de estudos com espécies mais sensíveis, com representatividade ecológica e econômica

dos ecossistemas aquáticos (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008). LOMBARDI (2004) ressalta a importância dos ensaios ecotoxicológicos para produtos químicos e medicamentos utilizados no tratamento de organismos aquáticos, a fim de avaliar sua eficácia, os possíveis efeitos negativos e a proteção dos organismos não alvos. No ambiente aquático muitas vezes os organismos estão expostos a agentes químicos em níveis não letais podendo não levar à morte do organismo, mas causando distúrbios fisiológicos e/ou comportamentais a longo prazo (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

Breve descrição do peixe *Danio rerio*

O peixe da família *Cyprinidae*, *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822), conhecido como paulistinha ou “zebrafish” (Figura 2) é originário de ambientes lânticos do sudoeste da Ásia e foi introduzido como modelo biológico na década de 1960 nos Estados Unidos. Desde a década de 1980 vem sendo empregado em vários estudos, graças a características como representatividade em relação ao grupo dos peixes e estabilidade genética. O *D. rerio* também tem se mostrado sensível mesmo quando exposto a baixíssimas doses de compostos químicos (MOURA e OLIVEIRA, 2014).



Figura 2: Aquário de reprodução do peixe *Danio rerio*.

HILL *et al.* (2005) afirmaram que as características do “zebrafish” o tornaram um modelo seguro em pesquisas e, salientam a facilidade de manutenção, baixo custo de obtenção dos reprodutores, pouca necessidade de espaço e precocidade reprodutiva, pois, com 3 meses após a eclosão já reproduzem, com alta taxa de fecundação, podendo desovar cerca de 200 ovos em uma postura e, os embriões são translúcidos (Figura 3) e assim facilitando a observação do desenvolvimento das estruturas corporais em curto espaço de tempo. Na última década houve um aumento do uso do peixe *D. rerio* em ensaios ecotoxicológicos, devido à alta sensibilidade a substâncias tóxicas (COSTA *et al.*, 2008; LAMMER *et al.*, 2009; OECD, 2013; BELANGER *et al.*, 2013).



Figura 3: Embrião de *Danio rerio* com 72 horas pós fertilização.

A dissertação está apresentada em capítulo único.

Artigo para publicação

“Fungicidas no controle de *Aphanomyces sp.* e seus feitos tóxicos no desenvolvimento embrionário do *Danio rerio*”

Artigo redigido nas normas do periódico científico

Diseases of Aquatic Organisms

Classificação A2 – CAPES – área Zootecnia e Recursos Pesqueiros

Referências bibliográficas

ADU, R.O. and THOMSEN, J.P. 2011 Improving Production of Zebrafish Embryos in the Lab. *Journal of Environmental Protection*, 2: 1360-1363.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. 1996 *Introductory Mycology*. New York, John Wiley & Sons, Inc. 865 p.

ALI, S.E.; EVENSEN, Ø.; SKAAR, I. 2015 Recent advances in the mitigation of *Saprolegnia* infections in freshwater fish and their eggs. In: *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs* (A. Méndez-Vilas, Ed.). Disponível em: <<http://www.microbiology5.org/microbiology5/book/691-697.pdf>>. Acesso em: Maio/2017.

ANDRADE, R.L.B. de; ANDRADE, L.S. de; BOSCOLO, W.R.; SOARES, C.M. 2005 Comportamento, sobrevivência e desenvolvimento de lebistes, *Poecilia reticulata*, submetidos a agentes utilizados na profilaxia de doenças. *Acta Sci. Anim. Sci. Maringá*, 27(4): 523-528.

BALDOC, F.C.; BLAZER, V.; CALLINAN, R.; HATAI, K.; KARUNASAGAR, I.; MOHAN, C.V.; BONDAD-REANTASO, M.G. 2005 Outcomes of a short expert consultation on epizootic ulcerative syndrome (EUS): Reexamination of causal factors, case definition and nomenclature.

BELANGER, S.E.; RAWLINGS, J.M.; CARR, G.J. 2013 Use of fish embryo toxicity tests for the prediction of acute fish toxicity to chemicals. *Environmental toxicology and chemistry* 32:1768-1783.

BOYD, C.E.; TUCKER, C.S. 1998 *Pond aquaculture water quality management*. Boston: Kluwer, 700p.

BRASIL, 2017 Produção de peixes no Brasil cresce com apoio de pesquisas da Embrapa. *Embrapa*. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2017/01/producao-de-peixes-no-brasil-cresce-com-apoio-de-pesquisas-da-embrapa>>. Acesso em Jun/2017.

CARRASCHI, S.P.; FLORÊNCIO, T.; GARLICH, N.; SILVA, A.F. da; MARQUES, A. M.; CRUZ, C. da; RANZANI-PAIVA, M. J. T. 2015 Ecotoxicology of drugs used in fish disease treatment. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*. Vol. 7(3): 31-36.

CORRÊA, B.F.; STOHLI, F.E.; ROBALDOII, R.B.; PEREIRAI, D.I.B. 2013 Efeito *in vitro* de químicos no crescimento micelial de *Saprolegnia* spp. *Ciência Rural*, 43(6): 1021-1024.

COSTA, C.R.; OLIVI, P.; BOTTA, C.M.R.; ESPINDOLA, E.L.G. 2008 A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, 31(7): 1820-1830.

DIÉGUEZ-URIBEONDO J.; GARCÍA, M.A.; CERENIUS, L.; KOZUBÍKOVÁ, E.; BALLESTEROS, I.; WINDELS, C.; WEILAND, J.; KATOR, H.; SÖDERHÄLL, K.; MARTÍN, M.P. 2009 Phylogenetic relationships among plant and animal parasites, and saprotrophs in *Aphanomyces* (Oomycetes). *Fungal Genet Biol* 46:365–376.

DYE, C., SCHLABACH, M., GREEN, J., REMBERGER, M., KAJ, L., PALM-COUSINS, A., BRORSTRÖMLUNDÉN, E. 2007 Bronopol; Chemical properties, fate and toxicity. In: *Bronopol, Resorcinol, m-Cresol and Triclosan in the Nordic Environment*. Nordic Council of Ministers, Denmark, 13-16pp. <disponível em: <http://www.norden.org/en/publications/publications/2007-585>> Acesso em Jun/2017.

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura 2016 El estado mundial de la pesca y la acuicultura: Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. *Relatório anual*. Roma. 192p.

FIGUEIREDO, H.C.P. e LEAL, C.A.G. 2008 Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. *Revista Brasileira Zootecnia*. Viçosa, 37(spe): 8-14.

FUANGSAWAT, W.; ABKING, N.; LAWHAVINIT, O.A. 2011 Sensitivity comparison of pathogenic aquatic fungal hyphae to sodium chloride, hydrogen peroxide, acetic acid and povidone iodine. *Kasetsart. Natural Science*, 45: 84-89.

HILL, A.; TERAOKA, H.; HEIDEMAN, W.; PETERSON, R. 2005 Zebrafish as a model vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. *Toxicological Sciences*, 86: 6-19.

KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; MINTER, D.W.; STALPERS, J.A. 2008 *Dictionary of Fungi*. 10 ed. CABI Bioscience, Wallingford. 771p.

LAMMER, E.; CARR, G.J.; WENDLER, K.; RAWLINGS, J.M.; BELANGER, S.E.; BRAUNBECK, T. 2009 Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 149: 196-209.

LASMAR, M.M.; LEITE, M.O.; FONSECA, L.M.; SOUZA, M.R.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; PENNA, C.F.A.M.; COUTO, C.N.B.; FERREIRA, J.M. 2011 Detection of cheese whey in raw milk preserved with bronopol through high performance liquid chromatography. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 63(6): 1553-1558.

LOMBARDI, J.V. 2004 Fundamentos de toxicologia aquática. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. 2004 *Sanidade de organismos aquáticos*. São Paulo: Varela, 263-272 p.

LUVIZOTTO-SANTOS, R.; ELER M.N.; ESPÍNDOLA, E.L.G.; VIEIRA; E.M. 2009 O uso de praguicidas nas pisciculturas e pesqueiros situados na bacia

do rio Mogi-Guaçu. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 35(3): 343 – 358.

MARTINS, M.L. 2004 Cuidados Básicos e Alternativas no Tratamento de Enfermidades de Peixes na Aqüicultura Brasileira In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. 2004 *Sanidade de organismos aquáticos*. São Paulo: Varela, 355 - 368 p.

MELENDRE, P.M.; CELADA, J.D.; CARRAL, J.M.; SÁEZ-ROYUELA, M.; AGUILERA, A. 2006 Effectiveness of antifungal treatments during artificial incubation of the signal crayfish eggs (*Pacifastacus leniusculus* Dana. *Astacidae*). *Aquaculture*, 257: 257-265.

MOURA, M.A.M. e OLIVEIRA, R de. 2014 Uso de embriões de peixe-zebra em ecotoxicologia. Comunicado técnico Número 201, de 17/04/2014, *Instituto Biológico*, São Paulo Brasil. Disponível em: <http://www.biológico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=201> Acesso em 16 de agosto de 2015.

NOGA, E.J.; DYKSTRA, M.J. 1986 Oomycete fungi associated with ulcerative mycosis in menhaden, *Brevoortia tyrannus* (Latrobe). *Journal of Fish Diseases* 9:47–53.

OECD, Organization for Economic Co-Operation and Development 2013 Guideline for Testing of Chemicals. Fish Embryo Toxicity (FET) Test (236). *OECD* Disponível em: <<http://www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264203709-en>> Acesso em Ago de 2015.

OONO, H.; HATAI, K.; MIURA, M.; TUCHIDA, N.; KIRYU, T. 2007 The use of bronopol to control fungal infection in rainbow trout eggs. *Biocontrol Science*, 12: 55–57.

OONO, H.; HATAI, K.; AIKAWA, H.; HARA, H. 2008 The used of bronopol to control fungal infections in ayu eggs. *Aquacult. Sci.*, 56, 9-12.

PAIXÃO, L.F.; SANTOS, R.F.B.; RAMOS, F.M.; FUJIMOTO, R.Y. 2013 Efeitos do tratamento com formalina e sulfato de cobre sobre os parâmetros hematológicos e parasitos monogenéticos em juvenis de *Hemigrammus* sp. (*Osteichthyes: Characidae*). *Acta Amazonica*. 43(2): 211 – 216.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.daC.; TAKEMOTO, R.M. 2008 *Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento*. 3. ed. Maringá: EDUEM, 311 p.

PRADHAN, P.; MOHAN, C.; SHANKAR, K.; KUMAR, B. 2008 Infection Experiments with *Aphanomyces invadans* in Advanced Fingerlings of Four Different Carp Species. In: Bondad-Reantaso M, Mohan C, Crumlish M, Subasinghe R, editors. *Diseases in Asian Aquaculture VI*. Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society. 105–114p.

SCOTT, W.W. 1961 *A monograph of the genus Aphanomyces*. Virginia Agri Exp Stat Tech Bull 151p.

SUDOVA, E.; MACHOVA, J.; SVOBODOVA, Z.; VESELY, T. 2007 Negative effects of malachite green and possibilities of its replacement in the treatment of fish eggs and fish: A review. *Veterinari Medicina*, 52:527–539.

SUN, Q.; HU, K.; YANG, X.L. 2014 The efficacy of copper sulfate in controlling infection of *Saprolegnia parasitica*. *Journal of the World Aquaculture Society* 45(2): 220-225.

TAKUMA, D.; SANO, A.; WADA, S.; KURATA, O.; HATAI, K. 2013 Two new species, *Aphanomyces izumoensis* sp. nov. and *Aphanomyces shimanensis* sp. nov. isolated from Ice Fish *Salangichthys microdon*. *International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology* 3(3): 67-76.

TAVECHIO, W.L.G.; GUIDELLI, G.; PORTZ, L. 2009 Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. *Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo*, 35(2): 335 – 341.

VALLADÃO, G.M.R.; GALLANI, S.U.; PILARSKI, F., 2015 Phytotherapy as an alternative for treating fish disease. *Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics*, 38: 417–428.

VENTURINI, F.P.; CRUZ, C.; PITELLI R.A. 2008 Acute toxicity of cupper sulfate and aqueous extract of dried leaves from neem for the snail (*Pomacea canaliculata*). *Acta Sci. Biol. Sci.* 30(2):179-184.

ZAGATTO, P.A. e BERTOLETTI. E. 2008 *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*. São Carlos. Ed. Rima, 464p.

CAPÍTULO ÚNICO

FUNGICIDAS NO CONTROLE DE *Aphanomyces* sp. E SEUS FEITOS TÓXICOS NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO *Danio rerio*

Karen de Souza FERREIRA^a, Débora Rodrigues da Silva COLOMBO^b, Cíntia BADARÓ-PEDROSO^c, Cláudia Maris FERREIRA^c, Leonardo TACHIBANA^c

(a) Pós-graduação do Instituto de Pesca – Av. Francisco Matarazzo, 455 - Água Branca, São Paulo – SP – Brasil. CEP 05001-000 – E-mail: karen_kdma@hotmail.com

(b) Ex-Bolsista PIBIC/CNPq Instituto de Pesca

(c) Endereço: Centro de Pesquisa em Aquicultura (CPA), Instituto de Pesca, APTA, SAA-SP. Av. Francisco Matarazzo, 455 – São Paulo, SP – E-mail:

RESUMO

Na piscicultura cerca de 10% das perdas ocorrem na incubação de ovos e larvicultura devido a doenças causadas por oomicetos. O oomiceto responsável pela morte de ovos do peixe *D. rerio* mantido no Instituto de Pesca foi identificado por taxonomia clássica e molecular até o gênero *Aphanomyces*. Ensaio com *Aphanomyces* em meio Yeast-Starch foram conduzidos para determinar as concentrações do sulfato de cobre (Cu), do azul de metileno (Am) e do bronopol (Br) responsáveis pela inibição de 50% (CI50;96h) e de 100% (concentração mínima inibitória-CMI) do crescimento micelial após 96h de exposição. Ensaio com ovos de *D. rerio* foram realizados para determinar as concentrações letais a 50% dos organismos (CL50;96h) e as maiores concentrações que não causam efeitos significativos na porcentagem de eclosão das larvas após 96h. Os valores das CI50; 96h foram 4,50 mg L⁻¹ Cu; 4,59 mg.L⁻¹ Br; 137,74 mg.L⁻¹ Am e as CMI 100 foram iguais a 10,2 mg.L⁻¹ Cu, 20 mg.L⁻¹ Br e 1275 mg.L⁻¹ Am. Os valores das CL50;96h foram 0,38 mg.L⁻¹ Cu; 27,31 mg.L⁻¹ Br e 40,54 mg.L⁻¹ Am. As maiores concentrações que não causaram efeito deletério significativo sobre a porcentagem de eclosão com valores de sobrevivência maiores que 90% foram iguais a 0,190 mg.L⁻¹ Cu, 1,0 mg.L⁻¹ Br e ≥ 10 mg.L⁻¹ Am, indicando a possibilidade do uso dos valores de 0,190 mg.L⁻¹ de cobre e de 1,0 mg.L⁻¹ de bronopol para o tratamento de ovos de *D. rerio* em sistema estático por 96h após mais estudos que demonstrem a ausência de efeitos nocivos no desenvolvimento e reprodução.

Palavras-chave: Oomiceto; efeito tóxico letal e subletal; sanidade; tratamento químico; peixe-zebra.

FUNGICIDES IN CONTROL OF *Aphanomyces* sp. AND ITS TOXIC DAMAGES IN THE EMBRYO DEVELOPMENT OF *Danio rerio*

ABSTRACT

In fish farming about 10% of losses occur at eggs and larvae in incubation due to diseases caused by oomycetes. The oomycete is responsible for eggs losses of *D. rerio* fish kept at the Fisheries Institute. It was identified by classical and molecular taxonomy as genus *Aphanomyces*. Assays with *Aphanomyces* in Yeast-Starch medium were conducted to determine the concentrations of copper sulfate (Cu), methylene blue (Am) and bronopol (Br) responsible for inhibition of 50% (IC₅₀, 96h) and 100% (minimal inhibitory concentration-MIC) of mycelial growth after 96h of exposure. Tests with *D. rerio* eggs were performed to determine lethal concentrations at 50% of the organisms (LC₅₀, 96h) and the highest concentrations that did not cause significant effects on the larval hatching percentage after 96h. IC₅₀ values; 96h were 4.50 mg L⁻¹ Cu; 4.59 mg.L⁻¹ Br; 137.74 mg.L⁻¹ Am and the MICs 100 were equal to 10.2 mg.L⁻¹ Cu, 20 mg.L⁻¹ Br and 1275 mg.L⁻¹ Am. The LC₅₀;96h values were, 0.38 mg.L⁻¹ Cu; 27.31 mg.L⁻¹ Br and > 40.54 mg.L⁻¹ Am. The highest concentrations that did not cause significant deleterious effect on the percentage of hatching with survival values greater than 90% were equal to 0.190 mg.L⁻¹ Cu, 1.0 mg.L⁻¹ Br and ≥ 10 mg.L⁻¹ Am, indicating the possibility of using the concentration of 0.190 mg.L⁻¹ of copper and 1.0 mg.L⁻¹ of bronopol for the treatment of *D. rerio* eggs in the static system for 96 h after further studies demonstrating the absence of harmful effects on development and reproduction.

Key words: Oomycetes; lethal and sublethal toxic effect; sanity; chemical treatment; zebrafish

1 Introdução

O desenvolvimento e a intensificação dos sistemas aquícolas têm favorecido a ocorrência de patógenos durante o ciclo produtivo. A expansão desta atividade e controle dos surtos de doenças tem gerado alguns problemas, ainda não mensurados para os ambientes aquáticos, como o uso não regulamentado de produtos químicos das mais diversas classes (Florêncio et al. 2014). Dentre as doenças, destacam-se as causadas por oomicetos (Portugal & Figueiredo 1995).

Ovos não fecundados e mortos são um excelente substrato para a proliferação dos oomicetos sapróbios e constituem um dos principais problemas para a larvicultura, pois podem ocasionar altas taxas de mortalidade (Shahbazian et al. 2010, Songe et al. 2016, De Swaef et al. 2016).

Oomicetos do gênero *Aphanomyces* (Reino *Straminipila*, Família *Leptolegniaceae*) (Kirk et al. 2008) incluem organismos sapróbios, fitoparasitas e patógeno de animais e, é um dos mais comuns causadores de doenças fúngicas em peixes na Ásia, Austrália e Europa (Takuma et al. 2013). No Brasil, existem registros em algumas pisciculturas e no ambiente natural. (Gomes & Pires-Zottarelli 2006, Pinheiro et al. 2015, Silva & Sousa Rocha 2017).

Entre as doenças de notificação obrigatória pelo MAPA (Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento) no Brasil a síndrome ulcerativa epizootica (EUS-epizootic ulcerative syndrome) é uma delas (BRASIL, 2013). Surgiu no início dos anos 80 na Ásia e atualmente há registro da sua ocorrência em 15 países deste continente. A mesma doença é conhecida por nomes diferentes dependendo da região, mas tem o mesmo agente etiológico, o oomiceto *Aphanomyces invadans* (Campbell et al. 2001, Scarfe, Cheng-Sheng Lee 2006, Lee 2015).

Segundo a Organização Mundial para Saúde Animal – OIE (2015) o Brasil não teve nenhum caso reportado da síndrome ulcerativa epizootica causada por *Aphanomyces invadans* (Campbell et al. 2001), porém, não se sabe se outras espécies de *Aphanomyces* já acometeram animais de criação no país, pois existem relatos para outros oomicetos, principalmente para *Saprolegnia* (Martins et al. 2002, Corrêa et al. 2013). Isso ocorre pois as patologias causadas por oomicetos apresentam sinais clínicos semelhantes (Pavanelli et al. 2002).

Na busca do tratamento das micoses tegumentares e de outras doenças são empregados vários produtos químicos como o formaldeído, bronopol, permanganato

de potássio, sulfato de cobre (Oono et al. 2007, Sudova et al. 2007, Fuangsawat et al. 2011, Corrêa et al. 2013, De Swaef et al. 2016), fitoterápicos e óleos essenciais (Borisutpeth et al. 2009, Valladão et al. 2015). Porém, nenhum produto está registrado no Brasil para esta enfermidade.

A utilização de produtos químicos é regida por legislação específica (Ostrensky et al. 2007), e no Brasil, poucos produtos são registrados para uso em aquicultura (Tavechio et al. 2009, Valladão et al. 2015), apenas os antibióticos florfenicol, oxitetraciclina, o ectoparasiticida Masoten[®] e a vacina Aquavac[®]-Strep Sa. Ali et al. (2015) ressaltam que existe uma pungente necessidade em se buscar produtos e vacinas que previnam a infecção e, que não causem impactos ao meio ambiente, mantendo a segurança alimentar e viabilidade econômica. As medidas profiláticas existentes e os tratamentos para as infecções fúngicas necessitam de estudos mais aprofundados que possibilitam um manejo e controle mais eficientes visando a manutenção da sanidade aquícola.

Diante disso, objetivou-se: isolar, cultivar e identificar a espécie de oomiceto que ocorre nos ovos de *Danio rerio* (peixe zebra); avaliar o efeito fungicida do sulfato de cobre, do bronopol e do azul de metileno no crescimento micelial do oomiceto; determinar os efeitos letais e subletais do sulfato de cobre, azul de metileno e do bronopol em embriões de *D. rerio*.

2 Material e Métodos

Todos os procedimentos realizados no estudo envolvendo animais seguiram os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Pesca (CEEAI) sob o número 1535/09-16.

2.1. Isolamento e identificação do patógeno

A cepa do oomiceto utilizada foi isolada de ovos coagulados de *Danio rerio* oriundos do laboratório de Criação de *D. rerio* localizado no Centro de Aquicultura do Instituto de Pesca APTA/SAA-SP. O isolamento seguiu a metodologia descrita por Corrêa et al. (2013) utilizando-se os antibióticos sulfato de estreptomicina, penicilina G e vancomicina nas concentrações de 0,1g, 0,2g e 0,02g.L⁻¹,

respectivamente (Nascimento & Pires-Zottarelli 2012), visando a purificação do isolado.

Placas com o isolado foram encaminhadas para identificação inicial no Laboratório de Micologia do Instituto de Botânica por taxonomia clássica e utilizou a chave taxonômica descrita por Johnson et al. (2002). A identificação por biologia molecular foi feita no laboratório de sequenciamento de DNA do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

A extração do DNA do oomiceto seguiu a metodologia descrita por Jerônimo et al. (2015) e utilizou-se os primers UN-up18S42 e UN-lo28S22 para amplificação da região transcrita interna (ITS) descrito por Robideau et al. (2011).

A sequência de DNA ribossomal (ITS rDNA) obtida foi comparada com as sequências disponíveis no banco de dados GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), através da ferramenta de busca “Nucleotide Basic Local Alignment Search tool” (BLASTn) (Takuma et al. 2013). A árvore filogenética pelo método de máxima verossimilhança foi realizada no programa MEGA 6 (Tamura et al. 2013).

2.2. Manutenção dos organismos testes

Após o crescimento e purificação, o isolado de *Aphanomyces* sp. foi transferido para placas com o meio de cultura YPSS (Levedura Amido Ágar) 10g de amido solúvel, 0,25g de fosfato de potássio, 0,125g de sulfato de magnésio, 0,25g de extrato de levedura, 15g de ágar por litro de água destilada (Emerson, 1941), previamente autoclavado. As placas foram mantidas em estufa de demanda biológica de oxigênio a $22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e repicadas para manutenção do oomiceto entre 10 a 15 dias.

Os peixes zebra foram mantidos segundo a Normativa NBR 15088 (ABNT 2016). No dia anterior ao ensaio, foram utilizados 4 trios de *D. rerio* para obtenção dos embriões, os casais eram formados na proporção de dois machos para uma fêmea (2M:1F), e eram estocados em aquários de reprodução separados por uma placa divisória por 12 horas em fotoperíodo (12h claro/ 12h escuro). Meia hora antes das luzes ascenderem por *timer* programado era retirada a divisória, e após 30 minutos verificava-se ocorrência da postura de ovos. Os ovos foram coletados e transferidos para placas de Petri, para a separação dos fecundados dos não-fecundados ou coagulados, com o auxílio de lupa e pipeta de Pasteur (Figura 1).

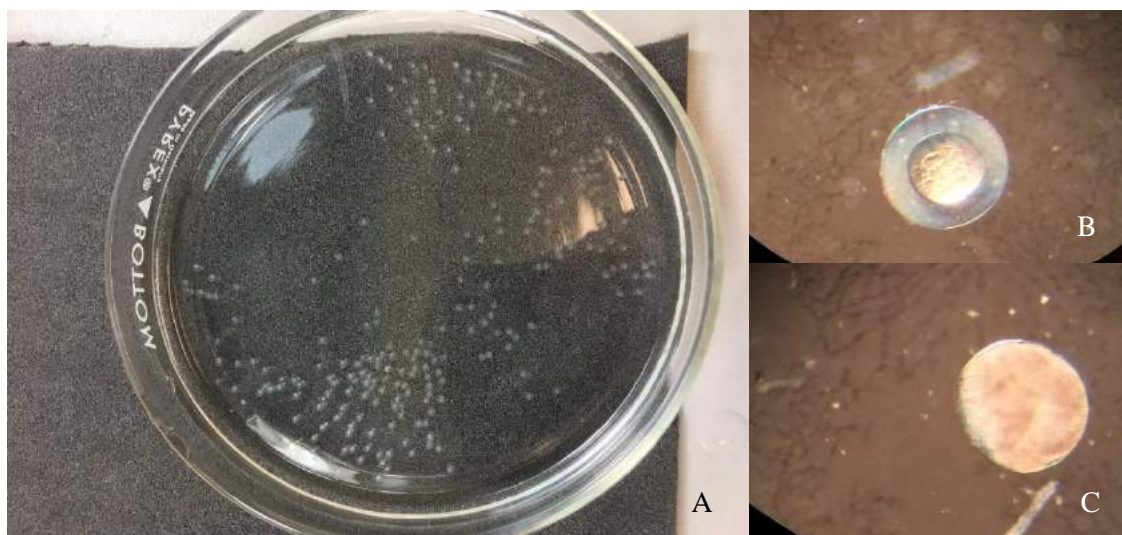


Figura 1: A: Seleção dos ovos de *Danio rerio* fertilizados para exposição aos fungicidas. B: Ovo viável para ensaio. C: Ovo coagulado.

2.3. Testes *in vitro* com *Aphanomyces* sp.

As seguintes substâncias foram utilizadas nos ensaios de inibição do crescimento e para os ensaios de concentração inibitória mínima: azul de metileno ($C_{16}H_{18}ClN_3S$), da InLab[®]; bronopol ($C_3H_6BrNO_4$), da Pyceze[®] Novartis Animal Vaccines Limited; e sulfato de cobre pentahidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), da Merck[®]. Ao longo do trabalho, o sulfato de cobre foi expresso em massa do metal cobre.

As soluções foram preparadas com água deionizada, em balões volumétricos de 100 mL. Após a homogeneização, a solução foi passada por filtro de 22 micrômetros, para não ocorrer contaminação.

A amostra micelial utilizada nos ensaios *in vitro* com sete dias no máximo de crescimento e, os discos com micélios de 6 mm foram retirados da periferia da placa (Campbell et al. 2001). O sulfato de cobre foi utilizado também como substância de referência para avaliar a sensibilidade de cada lote do oomiceto.

2.3.1. Ensaio concentração de inibição

Realizou-se ensaio utilizando as concentrações 0,01; 0,1; 1; 10; 100; 1000 e 10.000 mg.L⁻¹ para determinar as concentrações que não causaram efeitos e as que causaram efeitos deletérios no organismo, denominado de ensaio preliminar para todas as substâncias, preparou-se uma série de concentrações intermediárias entre as concentrações que causaram 0% a 100% de inibição do crescimento do patógeno.

A sensibilidade de cada lote repicado do oomiceto foi verificada, para isto, utilizou-se o sulfato de cobre como substância de referência (Zagatto & Bertolotti 2008, Paixão et al. 2013), paralelamente ao ensaio com as substâncias bronopol e azul de metileno, a fim de verificar se a cepa do oomiceto manteria a mesma sensibilidade durante todos os ensaios.

Nos ensaios definitivos, para determinar a concentração inibitória (CI) do produto químico que causou inibição do crescimento a 50% dos isolados, após 96 horas de exposição (CI50;96H) foram utilizadas as concentrações de 0,5; 1; 2; 4; 8 e 16 mg.L⁻¹ para CuSO₄, 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64 e 128 mg.L⁻¹ para bronopol, as concentrações 100; 150; 225; 337,5; 506,25; 759,38; 1.139,07 e 1.708,6 mg.L⁻¹ para o azul de metileno.

2.3.2. Ensaio concentração mínima inibitória

Realizou-se ensaios para obtenção da concentração mínima inibitória para 100% de crescimento (CMI100) (Fuangsawat et al. 2011), foram utilizadas as concentrações de 1; 1,46; 2,92; 4,37; 5,83; 7,29; 8,75 e 10,21 mg.L⁻¹ para cobre, 8; 12; 16; 20; 24; 28 e 32 mg.L⁻¹ para bronopol, 1.125; 1.150; 1.175; 1.200; 1.225; 1.250; 1.275 e 1.300 mg.L⁻¹ para azul de metileno.

As substâncias foram dissolvidas em água destilada e posteriormente no meio de cultura a 45°C, conforme a descrição da norma CLSI M38 A2 (2008). A mistura de cada concentração em meio YPSS foi vertida em placas de Petri e após a solidificação, um disco de 6 mm (Figura 2a) de diâmetro do cultivo do micélio do oomiceto foi disposto no centro da placa e mantida em estufa bacteriológica a 22°C, durante 96 horas em ausência de luz. Cada placa corresponde a uma repetição e, para cada tratamento foram preparadas triplicatas.

Além das concentrações das substâncias alvo, os ensaios apresentaram um grupo controle contendo apenas o meio de cultura com o oomiceto como controle positivo e, um grupo controle negativo somente com YPSS.

O efeito das substâncias sobre o crescimento micelial do patógeno foi avaliado através da medida diária do crescimento radial das colônias. As medidas, em centímetros, foram realizadas após 24, 48, 72 e 96 horas de incubação (Figura 2b).

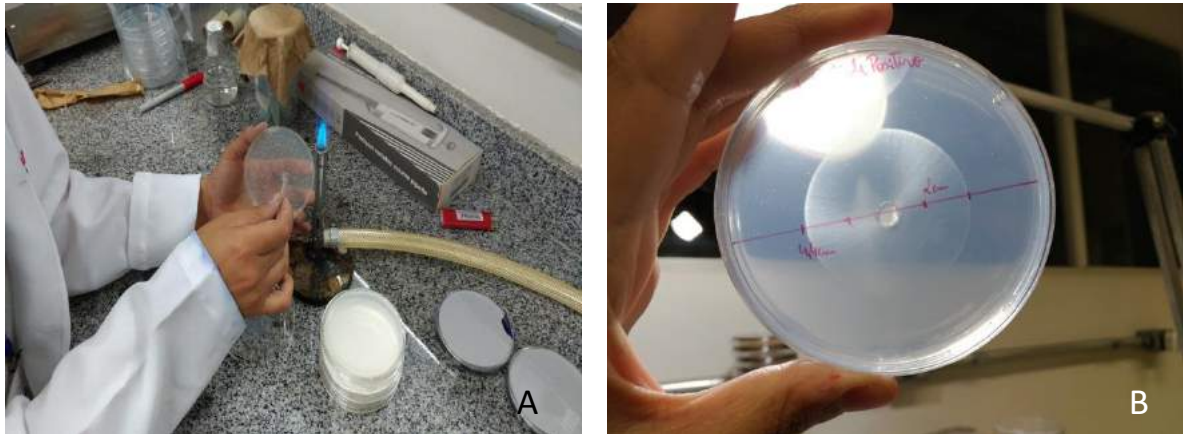


Figura 2: A: Repicagem em meio de cultura do oomiceto *Aphanomyces* sp. isolado de ovos de *D. rerio*. B: Medição do diâmetro da cultura na placa controle.

2.4. Testes *in vivo*

Para o ensaio de toxicidade *Fish Embryo Toxicity Test* “FET TEST” (OECD 2013), as concentrações utilizadas no ensaio preliminar foram de 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 e 100 mg.L⁻¹ para o bronopol e azul de metileno, as substâncias foram diluídas em água deionizada com dureza reconstituída para 40 mg de carbonato de cálcio (CaCO₃) (ABNT, 2016).

Para a substância de referência sulfato de cobre, utilizou-se as concentrações 0,033; 0,058; 0,105; 0,190; 0,343; 0,622; 1,126 e 2,039 mg.L⁻¹.

As concentrações definitivas para o bronopol e azul de metileno foram estabelecidas pelo intervalo das concentrações no teste preliminar. As concentrações foram 1; 2,2; 4,8; 10,6; 23,4; 51,5; 113,4 e 10,6; 23,4; 51,5; 113,4; 226,8; 498,9 e 1097,7 respectivamente.

O experimento consistiu em 8 tratamentos (7 concentrações para cada produto e controle) e 20 réplicas e delineamento inteiramente casualizado. Ovos recém fecundados com até 2 horas da postura foram expostos a soluções de cada produto químico. Apenas um ovo foi colocado por poço de 2 mL na microplaca de 24 poços. (Figura 3).

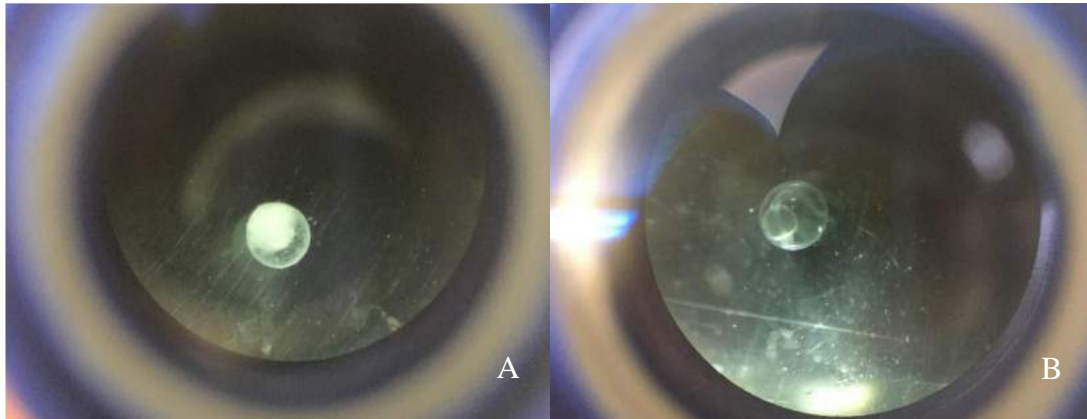


Figura 3: Leitura do ensaio, microplaca de 24 poços de 2 mL A: Ovo coagulado. B: Embrião controle com 24 horas pós fertilização.

Os critérios de sobrevivência, eclosão e malformação foram examinados diariamente através de um estereomicroscópio em aumento de 40x.

Efeitos agudos foram determinados pelos efeitos letais, e considerados como agudos a coagulação, ausência da formação de somitos, não desprendimento da cauda do saco vitelínico e ausência de batimento cardíaco (OECD 2013). Foram considerados efeitos subletais os edemas, má formações, escoliose e eclosão tardia (Lammer et al. 2009, Tesolin et al. 2014) (Figura 4).

Verificou-se a porcentagem de eclosão dos embriões após 96 horas de exposição em sistema estático, sem renovação das soluções.

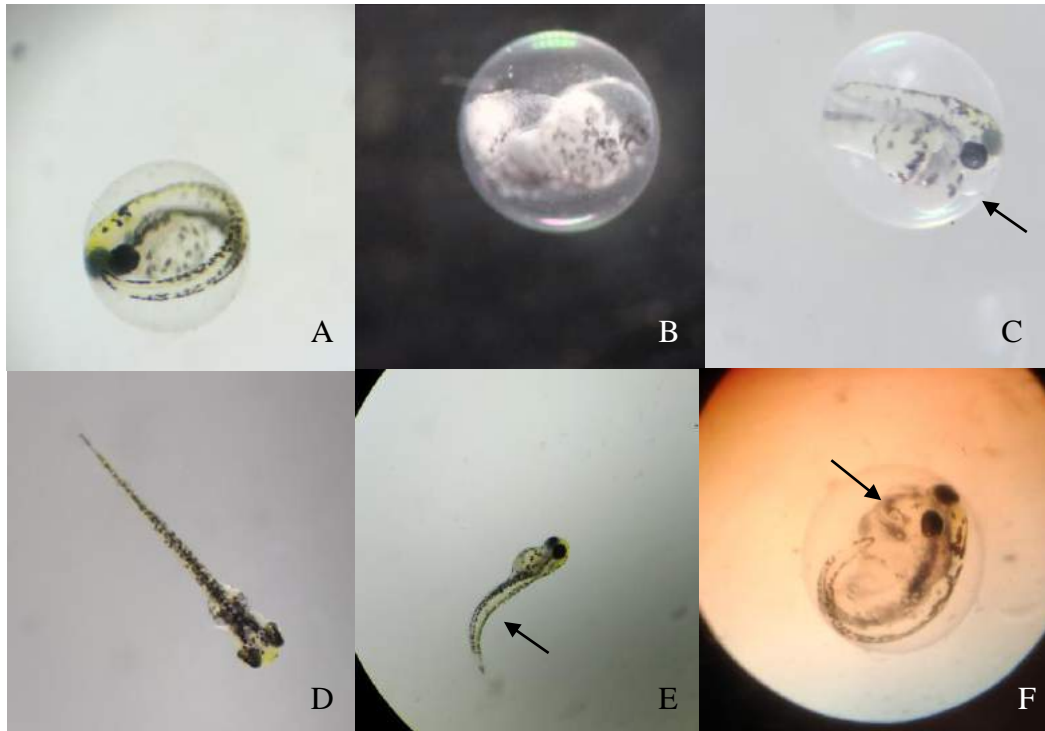


Figura 4: Efeitos subletais observados nos embriões e larvas de *D. rerio* em 96 horas após exposição aos produtos químicos sulfato de cobre, bronopol e azul de metileno. A: Eclosão tardia. B: Má formação do embrião. C: Edema de coração. D: Larva do controle negativo. E: Escoliose. F: Edema de saco vitelínico.

2.5. Validação dos ensaios

A validação dos ensaios foi realizada pela constatação, nos grupos controle, de taxa de crescimento igual ou superior a 80%, além da observação da média de crescimento dos ensaios (Zagatto & Bertoletti 2008).

Elaborou-se uma carta-controle de sensibilidade para as repicagens do oomiceto, visando-se avaliar a sensibilidade do organismo utilizado nos ensaios de toxicidade aguda. A carta-controle foi elaborada com os resultados das CE50; 96h do CuSO_4 , calculou-se a média dos valores correspondentes a dois desvios-padrão superior e inferior à média, assim estabelecendo um limite de aceitabilidade dos dados de $\pm 2S$ da média (Zagatto & Bertoletti 2008).

Para os ensaios *in vivo*, os resultados foram validados quando constatada a porcentagem de sobrevivência dos embriões do grupo controle superior de 80% e a taxa de eclosão \geq a 90%.

2.6. Análise estatística

Para obtenção do valor da concentração de inibição do crescimento em 50% (IC50) do diâmetro da cultura, no final de 96 horas foi estimada a CI50;96h utilizando o software ICp 2.0 (Norberg-King 1993) e CL50;96h utilizando o software Trimmed Spearman Karber (Hamilton et al. 1977) para exposição dos embriões.

Os resultados dos diâmetros da cultura foram analisados com o teste estatístico não-paramétrico Kruskal-Wallis, sob nível de significância de 5%.

3 Resultados

3.1. Identificação do patógeno

O patógeno isolado dos ovos foi identificado como *Aphanomyces* sp., não sendo possível afirmar a espécie por taxonomia clássica, uma vez que o isolado não apresentou estruturas de reprodução sexuada.

A sequência do rDNA obtida foi denominada *Aphanomyces* IP e pareou com uma das sequências disponíveis no GenBank, porém esta sequência não descreve a espécie, sendo assim, a região ITS corroborou a identificação morfológica (Figura 5).

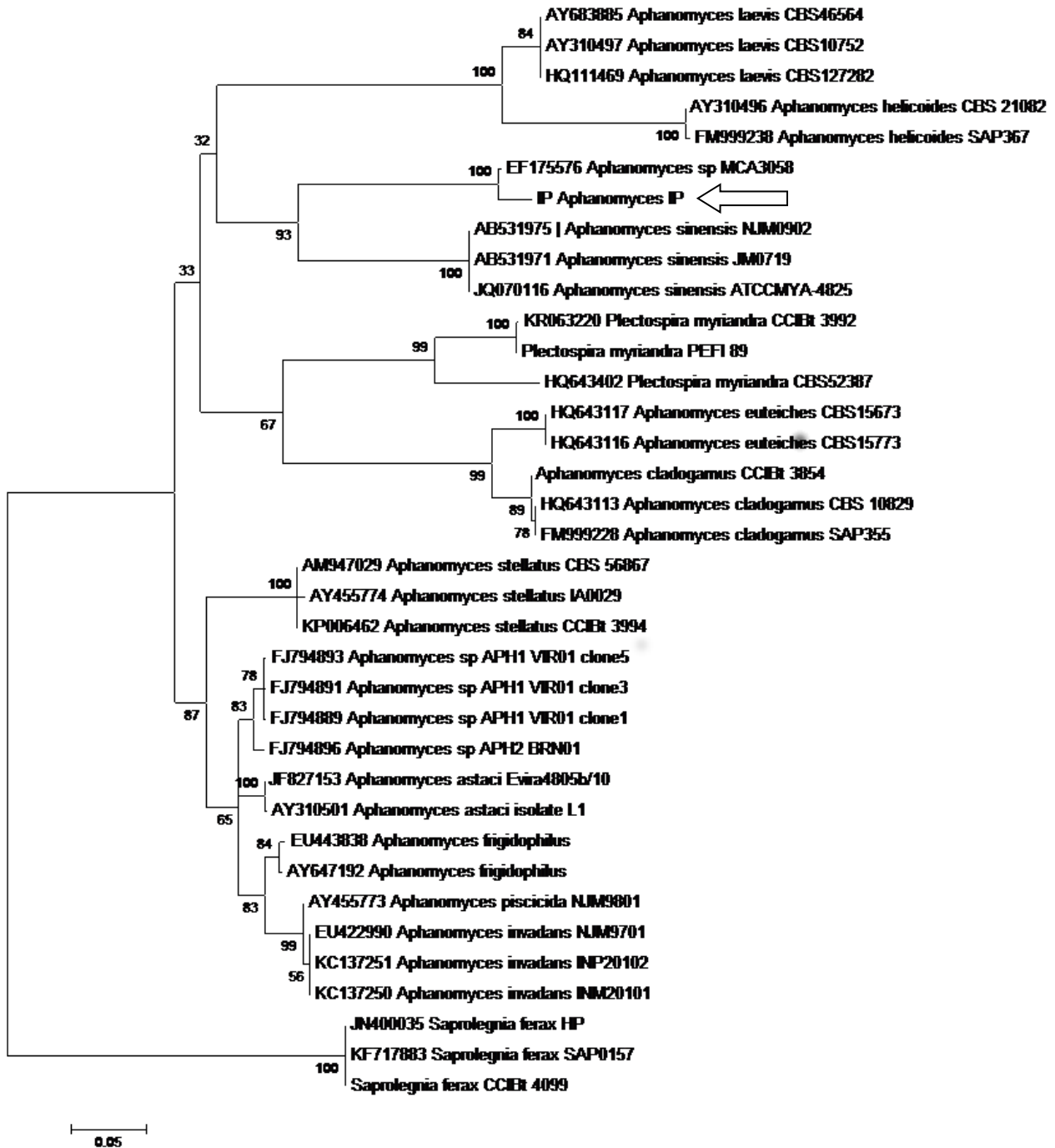


Figura 5: Árvore de máxima verossimilhança obtida pelo software MEGA 6 da região ITS do rDNA de *Aphanomyces* com as sequências próximas oriundas no programa BLASTn. *A seta indica a sequência do patógeno isolado de ovos de *D. rerio*.

3.2. Toxicidade: *Aphanomyces* sp.

Todas as repicagens para a manutenção do oomiceto, inclusive os controles positivos dos ensaios apresentaram crescimento total superior a 95% (8,10 cm) da placa em 96 horas após a inserção do bloco do ágar com micélio (Figura 1b).

As repicagens de *Aphanomyces* sp. utilizados durante os ensaios foram igualmente testadas com a substância de referência CuSO₄, tendo demonstrado níveis de sensibilidade dentro dos padrões aceitáveis, de acordo com a carta-controlle elaborada para o *Aphanomyces* (Tabela 1 e Figura 6).

Tabela 1: Concentração Inibitória 50% (CI50;96h) dos ensaios definitivos, limite superior, limite inferior e desvio padrão do sulfato de cobre para o oomiceto *Aphanomyces* sp. (n=3) isolado de ovos de *D. rerio*

| <i>Ensaio</i> | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | Média ± DP |
|--|------|------|------|------|------|------|------|-------------------|
| CI50; 96h (mg.L⁻¹) | 3,52 | 4,22 | 5,02 | 5,37 | 4,83 | 4,70 | 3,85 | 4,50 ± 0,61 |
| Limite Superior (Média CI50;96h + 2x Desvio padrão) | | | | | | | | 5,72 |
| Limite Inferior (Média CI50;96h - 2x Desvio padrão) | | | | | | | | 3,28 |

*DP: Desvio padrão.

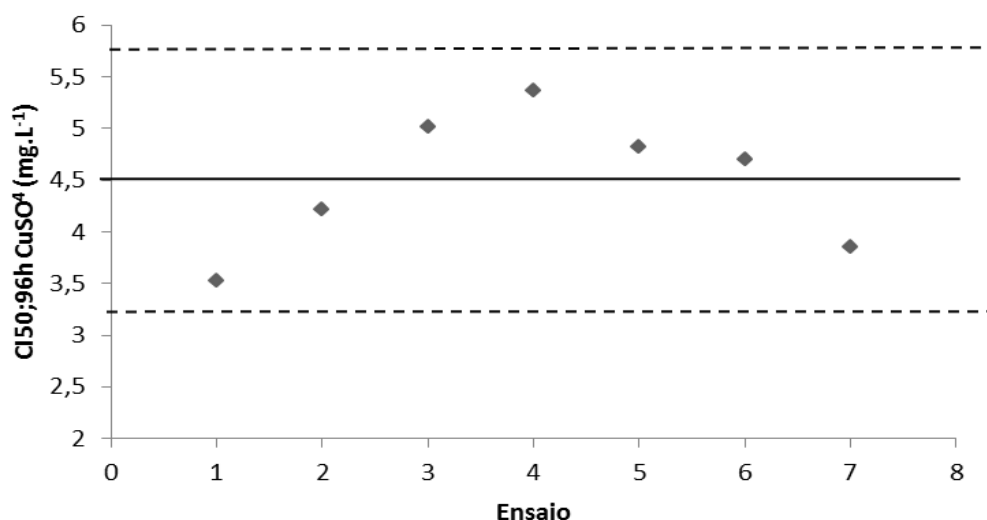


Figura 6: Carta - Controle da sensibilidade do oomiceto *Aphanomyces* sp. isolado de ovos de *D. rerio* à substância de referência sulfato de cobre em meio de cultura.

O coeficiente de variação (CV) foi calculado para os ensaios de sensibilidade com cobre e obteve-se um CV de 14,09%.

Para os ensaios realizados para a determinação da concentração de inibição de 50% do crescimento micelial (CI50) não ocorreram variações dos diâmetros da

cultura dos oomicetos entre as réplicas superiores a 0,69 cm e, no ensaio CMI100 as variações entre as réplicas não foram superiores a 0,96 cm (Tabela 3).

Tabela 2: Valores das concentrações inibitórias a 50% do crescimento micelial (CI50) e da concentração mínima inibitória para 100% (CMI100) do crescimento do micélio do oomiceto *Aphanomyces* sp. (n=3) após 96h de exposição a temperatura de 22°C ao sulfato de cobre, bronopol e azul de metileno.

| | CuSO₄ | Bronopol | Azul de metileno |
|------------------------------------|-------------------------|-----------------|-------------------------|
| CI50 (mg.L⁻¹) | 4,50 ± 0,61 | 4,59 | 137,37 |
| Intervalo de confiança | 2,99 a 5,80 | 4,07 a 5,18 | 106,02 a 178,96 |
| CMI 100 (mg.L⁻¹) | 10,21 | 20,00 | 1275,00 |

O diâmetro do crescimento das culturas do oomiceto *Aphanomyces* sp. foi calculado através das médias das réplicas (Figura 7).

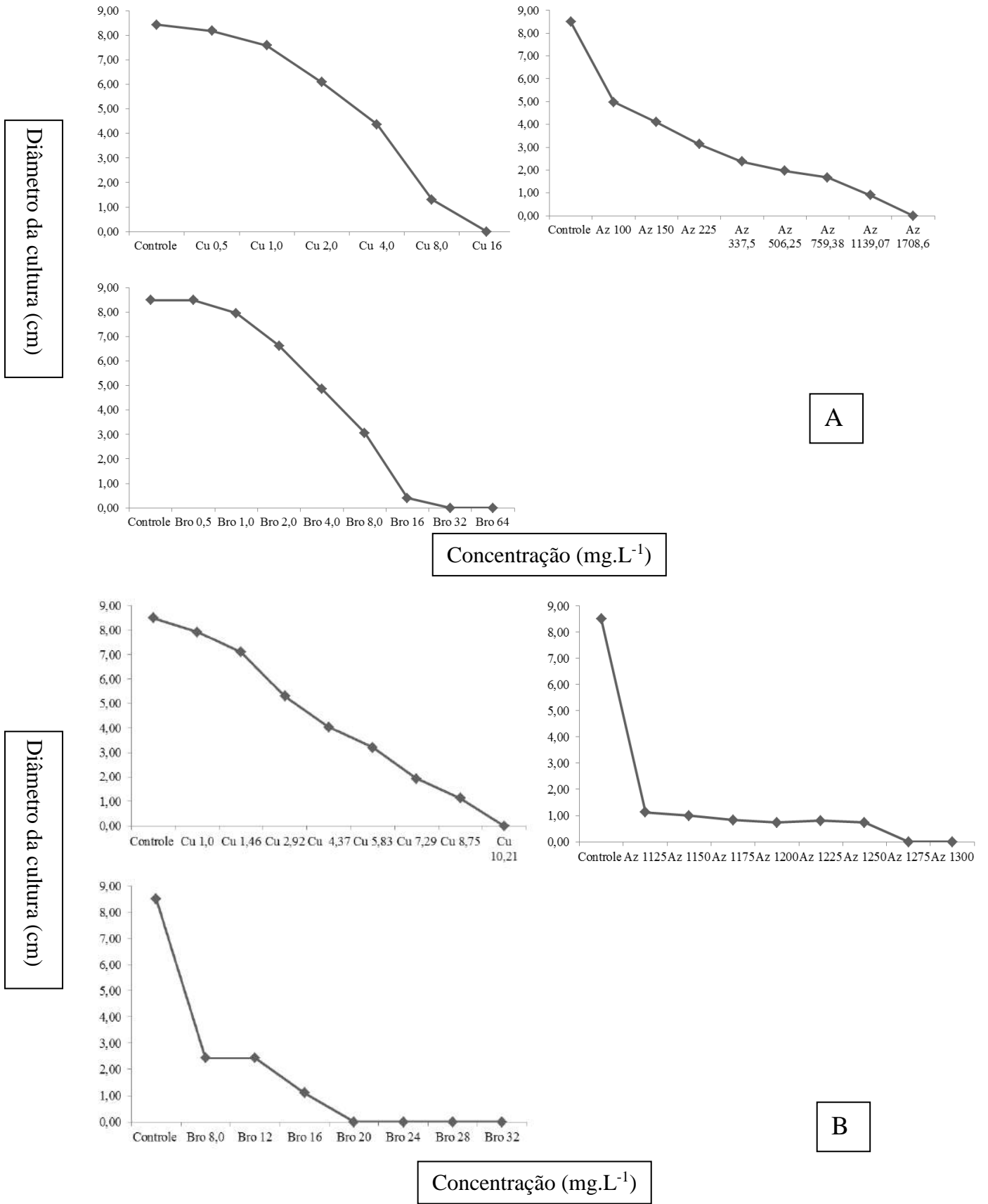


Figura 7: diâmetro da cultura do oomiceto *Aphanomyces* sp. (n=3) isolado de ovos de *D. rerio* frente aos produtos químicos sulfato de cobre, azul de metileno e bronopol em relação ao controle. A: CI50;96h. B: CMI100;96h.

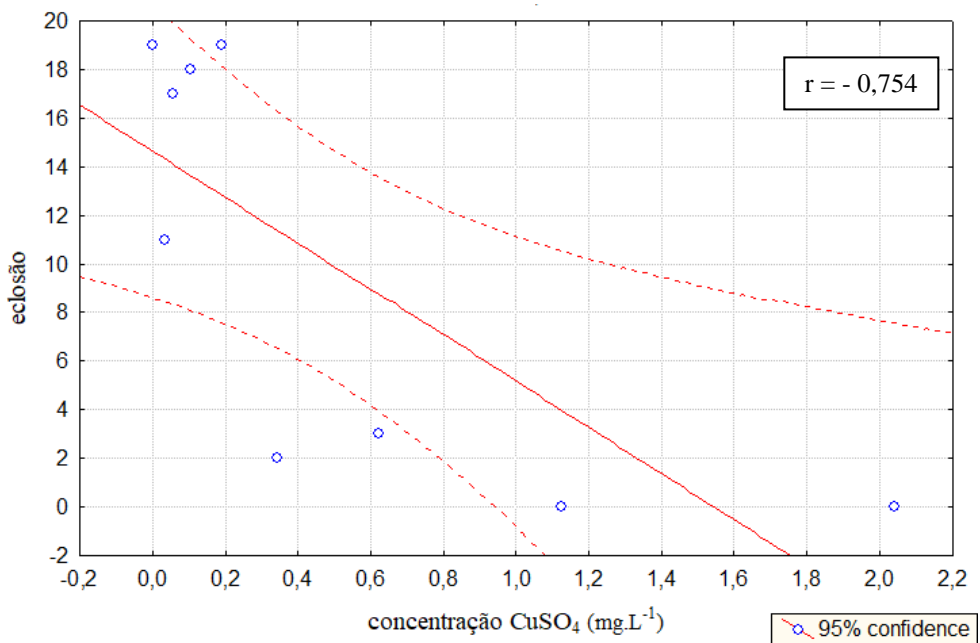
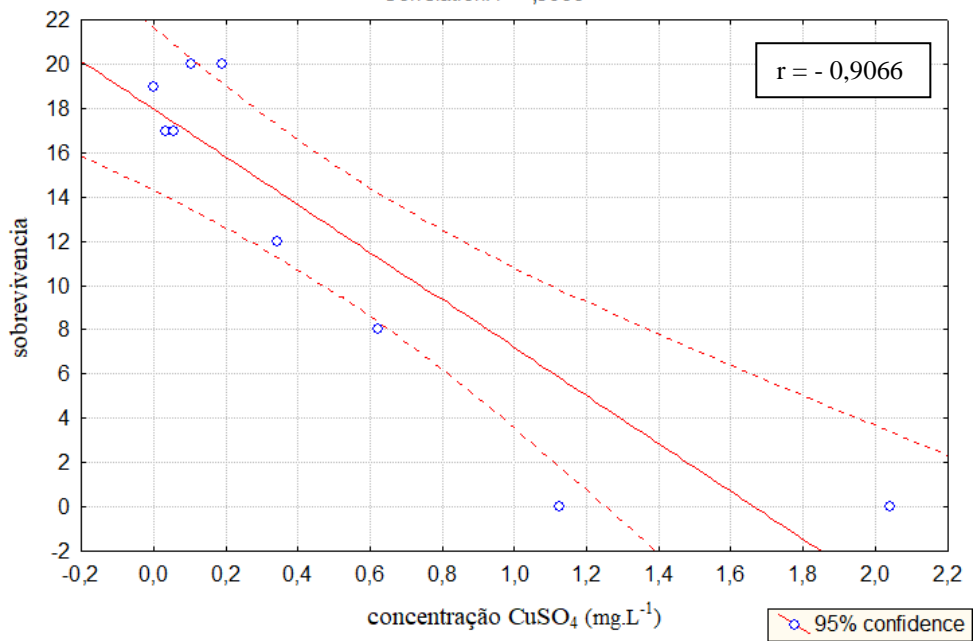
Tabela 3: Diâmetros das culturas dos ensaios de concentrações de inibição média (CI50) e concentração mínima de inibição de 100% (CMI100) crescimento do oomiceto *Aphanomyces* sp. (n=3) isolado de ovos de *D. rerio* frente aos produtos químicos sulfato de cobre, azul de metileno e bronopol.

| CI 50 | | | | | | | | | |
|---|-------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| CuSO₄ (mg.L⁻¹) | 0,00 | 0,50 | 1,00 | 2,00 | 4,00* | 8,00* | 16,00* | - | - |
| Diâmetro (cm) | 8,44 ± 0,11 | 8,31 ± 0,17 | 7,94 ± 0,29 | 6,38 ± 0,43 | 4,66 ± 0,38 | 2,02 ± 0,55 | 0,00 | | |
| Bronopol (mg.L⁻¹) | 0,00 | 0,50 | 1,00 | 2,00 | 4,00* | 8,00* | 16,00* | 32,00* | 64,00* |
| Diâmetro (cm) | 8,50 ± 0,00 | 8,50 ± 0,00 | 7,97 ± 0,21 | 6,63 ± 0,21 | 4,87 ± 0,06 | 3,07 ± 0,29 | 0,40 ± 0,69 | 0,00 | 0,00 |
| Azul de metileno (mg.L⁻¹) | 0,00 | 100,00 | 150,00 | 225,00 | 337,50* | 506,25* | 759,38* | 1139,07* | 1708,60* |
| Diâmetro (cm) | 8,50 ± 0,00 | 4,97 ± 0,12 | 4,10 ± 0,20 | 3,13 ± 0,21 | 2,37 ± 0,06 | 1,97 ± 0,06 | 1,67 ± 0,12 | 0,90 ± 0 | 0,00 |
| CMI 100 | | | | | | | | | |
| CuSO₄ (mg.L⁻¹) | 0,00 | 1,00 | 1,46 | 2,92 | 4,37 | 5,83 | 7,29* | 8,75* | 10,21* |
| Diâmetro (cm) | 8,50 ± 0,00 | 7,93 ± 0,12 | 7,10 ± 0,00 | 5,30 ± 0,00 | 4,03 ± 0,40 | 3,20 ± 0,30 | 1,93 ± 0,31 | 1,13 ± 0,15 | 0,00 |
| Bronopol (mg.L⁻¹) | 0,00 | 8,00 | 12,00 | 16,00 | 20,00 | 24,00 | 28,00 | 32,00 | - |
| Diâmetro (cm) | 8,50 ± 0,00 | 2,43 ± 0,31 | 2,43 ± 0,06 | 1,10 ± 0,96 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | |
| Azul de metileno (mg.L⁻¹) | 0,00 | 1125,00 | 1150,00 | 1175,00 | 1200,00 | 1225,00 | 1250,00 | 1275,00 | 1300,00 |
| Diâmetro (cm) | 8,50 ± 0,00 | 1,13 ± 0,06 | 1,00 ± 0,00 | 0,83 ± 0,06 | 0,73 ± 0,06 | 0,80 ± 0,00 | 0,73 ± 0,06 | 0,00 | 0,00 |

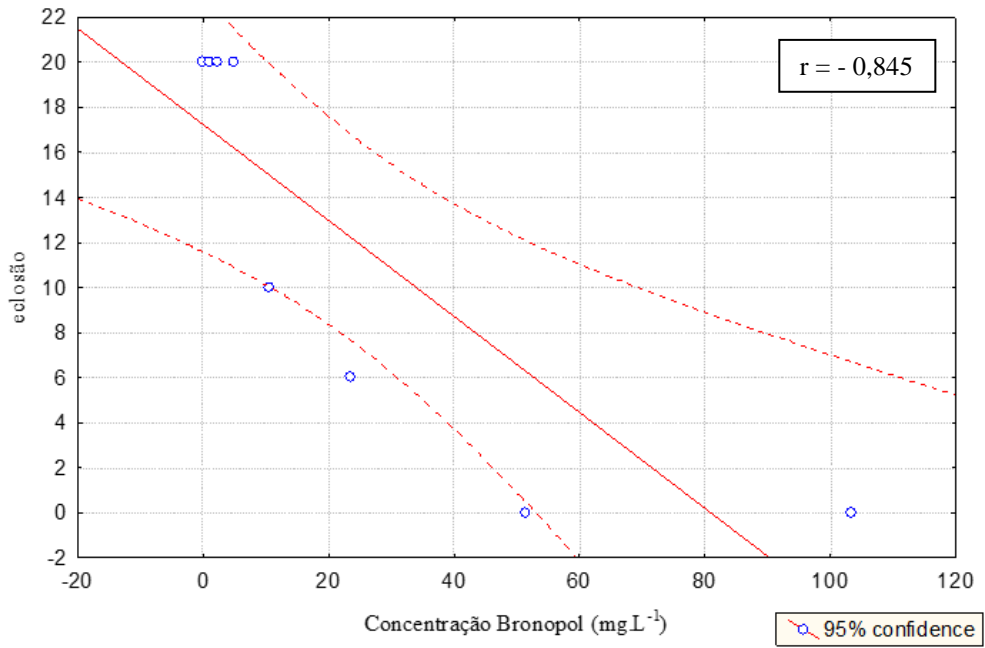
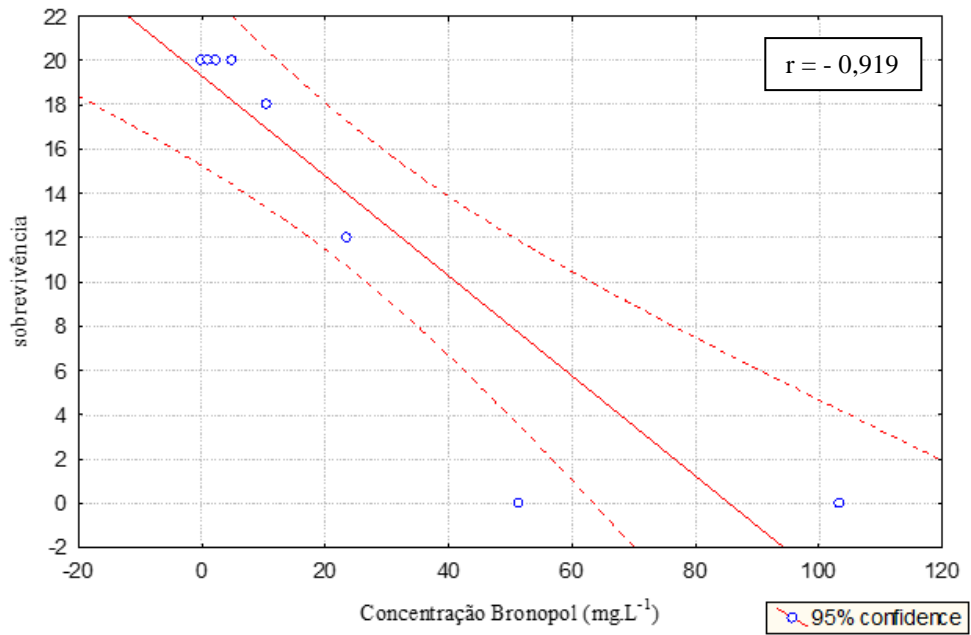
* Diferença estatística significativa em comparação ao controle (Teste Kruskal-Wallis, P<0,05). As concentrações de Azul de metileno e Bronopol do ensaio CMI100 foram escolhidas após verificação da significância e CI50;96h.

3.3. Toxicidade: *Danio rerio*

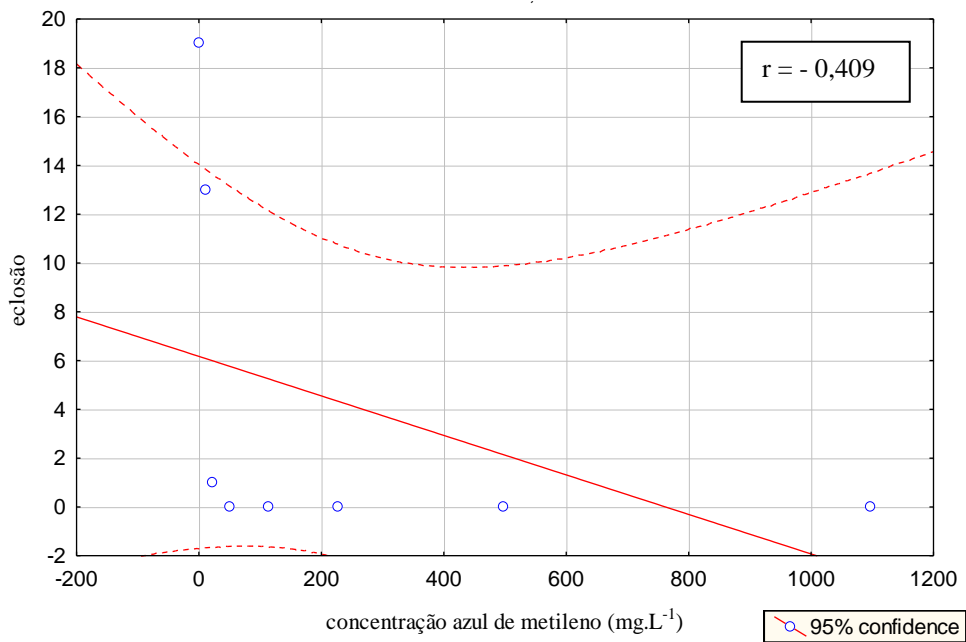
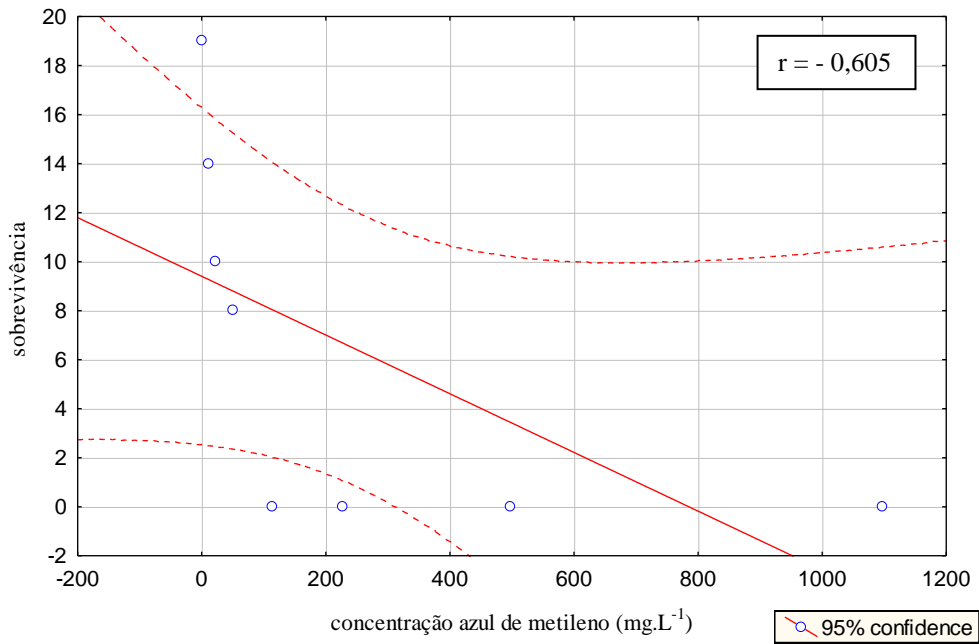
No ensaio definitivo *in vivo*, a taxa de mortalidade no controle foi de 5%, assim validando os resultados do ensaio. A taxa de eclosão do controle em 96 horas foi de 100%. A sobrevivência e eclosão dos embriões para os quimioterápicos em relação à concentração de exposição estão demonstrados na Figura 8.



A



B



C

Figura 8: Número de sobrevivência, eclosão dos embriões de *D. rerio* (n=20) expostos aos produtos químicos (A) sulfato de cobre, (B) bronopol e (C) azul de metileno.

Foi verificada a concentração letal 50% para os embriões de *D. rerio* com uma hora pós-fertilização (Tabela 4), a CL50 dos produtos químicos foi

determinada em 96 horas de exposição, os critérios utilizados para determinar a morte do embrião foram coagulação e ou ausência de batimentos cardíacos.

Tabela 4: Concentração Letal para 50% dos embriões de *D. rerio* expostos em 96 horas as substâncias sulfato de cobre, bronopol e azul de metileno em mg.L⁻¹. Calculado pelo software Trimmed Spearman Karber.

| CL50 96 horas (mg.L⁻¹) | | | |
|--|-------------------------|-----------------|-------------------------|
| | CuSO₄ | Bronopol | Azul de metileno |
| CL 50; 96h | 0,38 | 27,31 | 40,54 |
| Intervalo de confiança | 0,27 a 0,46 | 20,26 a 36,81 | 30,54 a 53,81 |

4 Discussão

O patógeno isolado dos ovos de *D. rerio*, o oomiceto *Aphanomyces* sp. causador da mortalidade em ovos é mais um registro da problemática da incubação e larvicultura, mesmo em laboratórios de criação. Woo et al. (2006) ressaltam que a família *Saprolegniaceae* e *Leptolegniaceae*, incluindo o gênero *Aphanomyces*, são responsáveis de forma significativa na inviabilização de ovos e infecções tegumentares em peixes adultos, contudo, Songe et al. (2016) demonstram que a infecção por *Saprolegnia* e outros oomicetos em ovos incubados de salmonídeos atinge mais de 10% da produção anual, isto resulta em perdas de produtividade e gastos operacionais.

Em alternativa aos produtos já utilizados, foram selecionados produtos químicos já empregados contra outras patologias, além das causadas por oomicetos, Luvizotto-Santos et al. (2009) realizaram pesquisa com 89 produtores de peixe e, observaram que, muitos produtos químicos sem registro específico para aquicultura são utilizados para tratamento de patologias, sendo citados o azul de metileno e o sulfato de cobre.

Com relação aos ensaios *in vitro*, houve uma pequena alteração nas médias entre os ensaios com sulfato de cobre (Tabela 1), o oomiceto apresentou um aumento do crescimento, porém, ficou evidente que os dados são homogêneos e dispersaram pouco em torno da média. Outra constatação que corrobora a verificação dos níveis aceitáveis na sensibilidade natural do organismo-teste (Figura 2b), cujos dados demonstram que houve apenas uma pequena variação do crescimento do inóculo no

grupo controle durante os ensaios. A variação se trata de um desvio natural durante o ensaio e a manutenção do organismo-teste, principalmente, com relação a temperatura do cultivo, cujos coeficientes de variação (CV) estiveram sempre dentro dos limites aceitáveis para ensaios ecotoxicológicos. Segundo Zagatto & Bertoletti (2008) a resposta deste organismo a substância de referência está de acordo com o padrão de aceitabilidade de ensaios laboratoriais.

A escolha do sulfato de cobre como substância de referência foi devida a sensibilidade demonstrada, CI₅₀;96h de $4,50 \pm 0,61 \text{ mg.L}^{-1}$ e pela grande utilização da substância no tratamento de diversas patologias (Carvalho et al. 2014), os resultados corroboram com os obtidos por Sun et al. (2014). O sulfato de cobre, neste trabalho, inibiu o crescimento do micélio de *Aphanomyces* sp. em concentração igual ou superior $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ (Figura 6 e 7). Sun et al. (2014) relatam que o sulfato de cobre controla o crescimento *in vitro* de *Saprolegnia parasítica* em concentrações superiores a $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$. A inibição total do crescimento da cultura em 96 horas foi $10,21 \text{ mg.L}^{-1}$ (tabela 2), resultado inferior, que os 50 mg.L^{-1} obtido por Panchai et al. (2015) para isolados do oomiceto *Achlya*.

A exposição de ovos recém-fertilizados causou coagulação em 100% dos ovos nas concentrações acima de $1,126 \text{ mg.L}^{-1}$, a mortalidade ocorreu em 24 horas de exposição. No ensaio *in vivo*, os embriões apresentaram uma sensibilidade alta ao sulfato de cobre, em concentrações acima de $0,343 \text{ mg.L}^{-1}$ (Figura 8a), causando a eclosão tardia, após 96 horas de observação, sendo a concentração letal média (CL₅₀) em 96 horas $0,38 \text{ mg.L}^{-1}$ (Tabela 4). Straus et al. (2009) realizaram experimentos para tratamento de *Saprolegnia* ssp. em ovos de *Ictalurus punctatus*, obtiveram uma taxa de sobrevivência de 69% dos embriões, utilizando a concentração 10 mg.L^{-1} de CuSO_4 .

Nos testes *in vitro* com o bronopol, obteve-se resultados de CI ₅₀;96h de $4,59 \text{ mg.L}^{-1}$, Stueland et al. (2005) utilizaram o bronopol como uma das substâncias fungistáticas para a *Saprolegnia parasítica*, a CMI₁₀₀;48h do crescimento do oomiceto foi o gradiente de concentração entre 10 a 50 mg.L^{-1} , resultado próximo ao obtido pelo presente trabalho de CMI₁₀₀;96h 20 mg.L^{-1} .

Nos testes *in vivo*, no presente trabalho obteve CL₅₀;96h para o bronopol igual a $27,31 \text{ mg.L}^{-1}$ e Oono et al. (2007) obtiveram uma CL₅₀;48h de 14 mg.L^{-1} para o bronopol em ovos de truta, demonstrando assim uma menor sensibilidade do peixe zebra ao produto. No entanto, o bronopol causou eclosão tardia em 50% na

concentração de 10,6 mg.L⁻¹ (Figura 8a), e as concentrações acima de 51,5 causaram coagulação em 100% dos embriões em até 24 horas (Figura 8b).

Segundo De Swaef et al. (2016) a concentração de bronopol na inibição do crescimento de *Saprolegnia* em ovos de truta é de 50 mg.L⁻¹ em banhos de 1 minuto, mas não se conhece os efeitos a longo prazo. Jantrakajorn & Wongtavatchai (2015) utilizaram o bronopol em banhos de até 30 minutos em larvas de *Oreochromis niloticus* e obtiveram uma sobrevivência acima de 89% na concentração 250 mg.L⁻¹. Ali et al. (2015) ressaltam que banhos com altas concentrações de bronopol não devem ultrapassar 30 minutos e mesmo em exposições em baixas concentrações, o bronopol já causa efeito agudo nos organismos tratados.

Os embriões expostos ao azul de metileno nas concentrações 1 e 10 mg.L⁻¹ apresentaram pigmentação do cório, de maneira que restringia a visualização de outras alterações no embrião até a eclosão, posteriormente as larvas apresentaram nado letárgico ou errático. Em banhos profiláticos em larvas de *Poecilia reticulata*, Andrade et al. (2005) utilizaram 3 mg.L⁻¹ de azul de metileno por 48 horas e, já nos primeiros minutos foi observado alteração na natação, mas, não foi observada mortalidade. Em comparação ao presente estudo, Sudova et al. (2007) mencionam o valor de 3,5 mg.L⁻¹ em banhos de 72 horas, as doses de inibição ao oomiceto são 33 vezes maiores, em ovos, não foi encontrado valores guia.

Dessa forma, acredita-se que o emprego do azul de metileno no controle da enfermidade em peixes seja restrito a baixas concentrações em ovos e mais elevada em banhos de curta duração para peixes adultos, devido às concentrações necessárias para a inibição do crescimento do oomiceto encontrarem-se bem acima dos níveis de tolerância (Sudova et al. 2007, Corrêa et al. 2013, De Swaef et al. 2016).

Os edemas, má formações e eclosão tardia são excelentes indicadores da toxicidade dos produtos químicos (figura 4), os efeitos observados vão de encontro com os obtidos por Tesolin et al. (2014) para mistura de agrotóxicos. De acordo com Florêncio et al. (2014) e Carraschi et al. (2015), grandes quantidades de xenobióticos são liberados no meio aquático, direta ou indiretamente, devido à expansão das atividades aquícolas, então se faz necessário o desenvolvimento de bioindicadores para o monitoramento ambiental. Por esta razão, a utilização de embriões de *D. rerio* em ensaios ecotoxicológicos de produtos utilizados na aquicultura se justifica por fornecer estimativas fidedignas de efeitos tóxicos para peixes (Zagatto & Bertolotti 2008).

Corrêa et al. (2013) ressaltam a importância da verificação da eficiência de produtos químicos *in vitro* a fim de evidenciar o efeito quimioterápico e nortear as concentrações para estudos *in vivo*. Segundo Nikinmaa (2014) a relação concentração-efeito está diretamente atrelada aos receptores ou capacidade do organismo de metabolizar uma determinada substância, porém, existe um linear para essa capacidade, devido aos mecanismos entre o xenobiótico e o organismo.

As substâncias que apresentaram as melhores eficiências como fungicidas *in vitro* no crescimento do *Aphanomyces* sp. foram o sulfato de cobre e o bronopol, com CE50;96h de $4,19 \pm 0,59$ mg.L⁻¹ e 4,59 mg.L⁻¹, respectivamente. O azul de metileno por ter apresentado uma CE50;96h 137,37 mg.L⁻¹ não se mostrou um produto viável como fungicida *in vitro* devido à grande quantidade necessária.

As maiores concentrações que não causaram efeito deletério significativo sobre a porcentagem de eclosão com valores de sobrevivência maiores que 80% foram iguais a 0,190 mg.L⁻¹ CuSO₄, 1,0 mg.L⁻¹ bronopol e 10,6 mg.L⁻¹ azul de metileno, indicando a possibilidade do uso dos valores de 0,190 mg.L⁻¹ de cobre e de 1,0 mg.L⁻¹ de bronopol para o tratamento de ovos de *D. rerio* em sistema estático por 96 horas após mais estudos que demonstrem a ausência de efeitos nocivos no desenvolvimento e reprodução.

5 Conclusões

Os resultados obtidos demonstraram o potencial efeito fungicida dos produtos. Os compostos químicos bronopol e sulfato de cobre foram eficazes na inibição do crescimento micelial do isolado *Aphanomyces* sp. acima de 50% na concentração de 4 mg.L⁻¹. O azul de metileno inibiu 48% do crescimento em 150 mg.L⁻¹. A inibição de 100% do crescimento micelial do patógeno após exposição ao sulfato de cobre, azul de metileno e bronopol foram respectivamente de 10,2 mg.L⁻¹, 1275 mg.L⁻¹ e 20 mg.L⁻¹.

In vivo, o sulfato de cobre causou efeitos letais nos embriões em concentrações acima de 1,126 mg.L⁻¹ e, que o bronopol não causou efeitos adversos em concentrações abaixo de 10 mg.L⁻¹. O azul de metileno não inibiu o crescimento micelial em concentrações abaixo de 100 mg.L⁻¹, entretanto, o ensaio *in vivo* possibilita o uso em concentrações mais baixas como 10 mg.L⁻¹. Embora o CuSO₄

apresentou as melhores respostas nos ensaios *in vitro*, *in vivo* causou mortalidade em baixas concentrações. Contudo, o bronopol seria adequado para tratamento de ovos de peixes.

Desta maneira, possibilita um controle efetivo da patologia sem causar efeitos aos organismos tratados, salientando que só é possível o controle do patógeno se juntamente aliar o manejo sanitário correto, sempre visando a manutenção da sanidade aquícola.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES pela bolsa de mestrado da primeira autora, ao Instituto de Pesca – APTA/SP pelo suporte e instalações. A pesquisadora Dra. *Yara Aiko Tabata* da APTA/Pólos/UPD - Campos do Jordão por colaboração no fornecimento de produtos laboratoriais. A pesquisadora Dra. *Carmen Lidia Amorim Pires Zottarelli* e a Msc. *Sarah Cristina Oliveira Rocha* do Instituto de Botânica – SMA/SP pela identificação do oomiceto. A pesquisadora Dra. *Eliane Vieira* do Instituto Biológico – APTA/SP e a Msc. *Rebeca Fabbro* do Instituto de Química da UFMS por auxiliarem nas análises químicas.

Esta pesquisa não recebeu qualquer concessão específica de agências de financiamento no setor público, comercial ou setores sem fins lucrativos.

Referências bibliográficas

- Ali SE, Evensen Ø, Skaar I (2015) Recent advances in the mitigation of *Saprolegnia* infections in freshwater fish and their eggs. :691–697
- Andrade RLB De, Andrade LS De, Boscolo WR, Soares CM (2005) Comportamento, sobrevivência e desenvolvimento de lebistes, *Poecilia reticulata*, submetidos a agentes utilizados na profilaxia de doenças. Acta Sci Anim Sci 27:523–528
- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas (2016) ABNT NBR 15088 Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda. Rio de Janeiro
- Borisutpeth P, Kanbutra P, Hanjavanit C, Chukanhom K, Funaki D, Hatai K (2009) Effects of Thai Herbs on the Control of Fungal Infection in Tilapia Eggs and the

- Toxicity to the Eggs. *Aquac Sci* 57:475–482
- BRASIL (2013) Instrução normativa N° 50, de 24 de setembro de 2013. MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- Campbell RE, Lilley JH, Panyawachira V, Kanchanakhan S (2001) *In vitro* screening of novel treatments for *Aphanomyces invadans*. *Aquac Res* 32:223–233
- Carraschi SP, Florêncio T, Garlich N, Ferreira A, Marques M, Cruz C, Ranzani-Paiva MJT (2015) Ecotoxicology of drugs used in fish disease treatment. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology* 7:31–36
- Carvalho S de, Paiva MJTR, França JG de, Neto FF, Oliveira Ribeiro CA de, Lombardi JV (2014) Redox dysregulation and bioaccumulation of copper in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquac Res* 45:736–741
- CLSI - Clinical and Laboratory Standard Institute (2008) M38-A2 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. Second Edition. *Clin Lab Stand Inst* 28:29
- Corrêa BF, Stohl FE, Robaldo RB, Pereira DIB (2013) Efeito *in vitro* de químicos no crescimento micelial de *Saprolegnia* spp. *Ciência Rural* 43:1021–1024
- De Swaef E, Broeck W Van den, Dierckens K, Decostere A (2016) Disinfection of teleost eggs: a review. *Rev Aquac* 8:321–341
- Emerson R (1941) *An Experimental Study of the Life Cycles and Taxonomy of Allomyces*, 8° edn. Lloyd Library and Museum
- Florêncio T, Carraschi SP, Cruz C Da, Silva AF Da, Marques AM, Pitelli RA (2014) Neotropical bioindicators of ecotoxicity and environmental risk of drugs with aquaculture interest. *Bol do Inst Pesca* 40:569–576
- Fuangawat W, Abking N, Lawhavinit OA (2011) Sensitivity comparison of pathogenic aquatic fungal hyphae to sodium chloride, hydrogen peroxide, acetic acid and povidone iodine. *Kasetsart J - Nat Sci* 45:84–89
- Gomes AL, Pires-Zottarelli CLA (2006) Diversidade de Oomycota da Reserva

- Biológica de Paranapiacaba, Santo André, SP: primeiras citações para o Brasil. *Rev Bras Botânica* 29:569–577
- Hamilton MA, Russo RC, Thurston R V. (1977) Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ Sci Technol* 11:714–719
- Jantrakajorn S, Wongtavatchai J (2015) Egg surface decontamination with bronopol increases larval survival of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Czech J Anim Sci* 60:436–442
- Jerônimo GH, Lucia De Jesus A, Marano AV, James TY, Ivanildo De Souza J, Oliveira Rocha SC, Lidia C, Pires-Zottarelli A (2015) Diversidade de *Blastocladiomycota* e *Chytridiomycota* do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Cananéia, SP, Brasil. *Hoehnea* 42:135–163
- Johnson Jr TW, Seymour RL, Padgett DE (2002) Biology and Systematics of the *Saprolegniaceae*.
- Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA (2008) Dictionary of The Fungi. *Mycol Res* 106:507–508
- Lammer E, Carr GJ, Wendler K, Rawlings JM, Belanger SE, Braunbeck T (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol* 149:196–209
- Lee C-S (2015) Overview of Fish Immune System and Infectious Diseases. In: Dietary Nutrients, Additives and Fish Health.p 376
- Luvizotto-Santos R, Eler MN, Espíndola EL., Vieira EM (2009) O uso de praguicidas nas pisciculturas e pesqueiros situados na bacia do Rio Mogi-Guaçu. *Bol do Inst de Pesca* 35:343–358
- Martins ML, Onaka EM, Ruas De Moraes F, Bozzo FR, Mello A De, Paiva FC, Gonçalves A (2002) Recent studies on parasitic infections of freshwater cultivated fish in the state of São Paulo, Brazil. *Acta Sci Mar* 24:981–985

- Nascimento C de A, Pires-Zottarelli CLA (2012) Diversidade de fungos zoospóricos da Reserva Biológica de Mogi Guaçu, estado de São Paulo, Brasil. *Rodriguésia* 63:587–611
- Nikinmaa N (2014) An Introduction to Aquatic Toxicology. II:253
- Norberg-King TJ (1993) A Linear Interpolation Method for Sublethal Toxicity: The Inhibition Concentration (ICp) Approach (Version 2.0). Duluth, Minnesota
- OECD (2013) Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Guidel Test Chem Sect 2, OECD Publ:1–22
- OIE (2015) Infection with *Aphanomyces invadans* (Epizootic ulcerative syndrome). Man Diagnostic Tests Aquat Anim:1–14
- Oono H, Hatai K, Miura M, Tuchida N, Kiryu T (2007) The use of bronopol to control fungal infection in rainbow trout eggs. *Biocontrol Sci* 12:55–57
- Ostrensky A, Borghetti JR, Soto D (2007) Estudo setorial para consolidação de uma aquicultura sustentável no Brasil. :279
- Paixão LF, Santos RFB, Ramos FM, Fujimoto RY (2013) Efeitos do tratamento com formalina e sulfato de cobre sobre os parâmetros hematológicos e parasitos monogenéticos em juvenis de *Hemigrammus* sp. (Osteichthyes: Characidae). *Acta Amaz* 43:211–216
- Panchai K, Hanjavanit C, Rujinanont N, Wada S, Kurata O, Hatai K (2015) Experimental pathogenicity of *Achlya* species from cultured Nile tilapia to Nile tilapia fry in Thailand. *AAFL Bioflux* 8:70–81
- Pavanelli GC, Eiras JC, Takemoto RM (2002) Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. EDUEM. Maringá, Paraná. 311p.
- Pinheiro CAM, Pinheiro RS, Santos WHL dos, Serra, Ilka MR de S, Santos DMS (2015) Qualidade da água e incidência de fungos em peixes oriundos de pisciculturas do município de São Luís – Maranhão. *Pesqui em Foco* 20:53–69
- Portugal MASC, Figueiredo MB (1995) Fungos aquáticos. *Biol* 57:13–16

- Robideau GP, Cock AWAM De, Coffey MD, Voglmayr H, Brouwer H, Bala K, Chitty DW, Désaulniers N, Eggertson QA, Gachon CMM, Hu CH, Küpper FC, Rintoul TL, Sarhan E, Verstappen ECP, Zhang Y, Bonants PJM, Ristaino JB, André Lévesque C (2011) DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Mol Ecol Resour* 11:1002–1011
- Scarfe, Cheng-Sheng Lee PJO (2006) Aquaculture Biosecurity Prevention, Control, and Eradication of Aquatic Animal Disease. In: *Aquaculture Biosecurity*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, p 175
- Shahbazian N, Ebrahimzadeh Mousavi HA, Soltani M, Khosravi AR, Mirzargar S, Sharifpour I (2010) Fungal contamination in rainbow trout eggs in Kermanshah province propagations with emphasis on *Saprolegniaceae*. *Iran J Fish Sci* 9:151–160
- Silva JB da, Sousa Rocha J de R de (2017) Oomycetes (Oomycota) from Maranhão State, Brazil 1. *Hoehnea* 44:394–406
- Songe MM, Willems A, Wiik-Nielsen J, Thoen E, Evensen O, West P van, Skaar I (2016) *Saprolegnia diclina* IIIA and *S. parasitica* employ different infection strategies when colonizing eggs of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Dis* 39:343–352
- Straus DL, Mitchell AJ, Carter RR, Steeby JA (2009) Optimizing Copper Sulfate Treatments for Fungus Control on Channel Catfish Eggs. *J Aquat Anim Health* 21:91–97
- Stueland S, Tafjord Heier B, Skaar I (2005) A simple *in vitro* screening method to determine the effects of drugs against growth of *Saprolegnia parasitica*. *Mycol Prog* 4:273–279
- Sudova E, Machova J, Svobodova Z, Vesely T (2007) Negative effects of malachite green and possibilities of its replacement in the treatment of fish eggs and fish: A review. *Vet Med (Praha)* 52:527–539
- Sun Q, Hu K, Yang X Le (2014) The Efficacy of Copper Sulfate in Controlling

Infection of *Saprolegnia parasitica*. J World Aquac Soc 45:220–225

Takuma D, Sano A, Hatai K (2013) Two new species, *Aphanomyces izumoensis* sp. nov. and *Aphanomyces shimanensis* sp. nov. isolated from Ice Fish *Salangichthys microdon*. Int J Res Pure Appl Microbiol 3:67–76

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Mol Biol Evol 30:2725–2729

Tavechio WLG, Guidelli G, Portz L (2009) Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. Bol do Inst Pesca 35:335–341

Tesolin GAS, Marson MM, Jonsson CM, Nogueira AJA, Siqueira Franco DA De, Almeida SDB De, Matallo MB, Moura MAM De (2014) Avaliação da toxicidade de herbicidas usados em cana-de-açúcar para o Paulistinha (*Danio rerio*). Mundo da Saude 38:86–97

Valladão GMR, Gallani SU, Pilarski F (2015) Phytotherapy as an alternative for treating fish disease. J Vet Pharmacol Ther 38:417–428

Woo PTK, Leatherland JF (John F., Bruno DW (David W. (2006) Fish diseases and disorders. CABI Pub

Zagatto PA, Bertoletti E (2008) Ecotoxicologia aquática princípios e aplicações. (E Bertoletti, Org.), 2º edn. Rima, São Carlos 478p.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos dos fungicidas sulfato de cobre, bronopol e do azul de metileno no crescimento micelial de *Aphanomyces* sp. e em embriões de *Danio rerio*. Alcançamos o objetivo previsto inicialmente, obtendo resultados significativos.

Por meio dos experimentos realizados conseguimos obter o gênero do patógeno causador da mortalidade dos embriões do peixe zebra no Laboratório de Criação do Instituto de Pesca.

Os resultados obtidos demonstraram o sucesso no isolamento e cultivo do patógeno em meio de cultura, demonstrou-se que os compostos químicos são eficazes na inibição *in vitro* do crescimento micelial do isolado *Aphanomyces* sp. e os efeitos letais e subletais dos produtos em embriões de *D. rerio*.

Os resultados do presente trabalho podem nortear novos estudos de outros produtos utilizados no tratamento de patologias de organismos aquáticos e, assim manter a sanidade aquícola e ambiental.