

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Ciências Biológicas - Bacharelado



Trabalho de Conclusão de Curso

Efeito *in vitro* de cloreto de sódio, iodeto de polivinilpirrolidona, formalina e permanganato de potássio no controle de *Saprolegnia* spp. em ovos de peixes-rei

Bruna Ferraz Corrêa

Pelotas, 2011

Bruna Ferraz Corrêa

Efeito *in vitro* de cloreto de sódio, iodeto de polivinilpirrolidona, formalina e permanganato de potássio no controle de *Saprolegnia* spp. em ovos de peixes-rei

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Daniela Isabel Brayer Pereira

Coorientador: Ricardo Berteaux Robaldo

Pelotas, 2011

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

C824e Corrêa, Bruna Ferraz

Efeito *in vitro* de cloreto de sódio, iodeto de polivinilpirrolidona, formalina e permanganato de potássio no controle de *Saprolegnia* spp. em ovos de peixe-rei / Bruna Ferraz Corrêa. – 37p. : tab. – Monografia (Conclusão de curso). Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2011. – Orientador Daniela Isabel Brayer Pereira ; co-orientador Ricardo Berteaux Robaldo.

1.Biologia. 2.Aquicultura. 3.*Odontesthes bonariensis*.
4.*Odontesthes humensis*. 5.Oomicetos. 6.Patógenos. 7.Químicos.
8.Saprolegniales. 9.Peixe-rei. I.Pereira, Daniela Isabel Brayer.
II.Robaldo, Ricardo Berteaux. III.Título.

CDD: 597.0929

Banca Examinadora:

Profª Dra. Daniela Isabel Brayer Pereira

Profª Dra. Patrícia da Silva Nascente

Prof. Dr. Sérgio Renato Noguez Piedras

Msc. Anelise Oliveira da Silva Fonseca

Agradecimentos

A Deus, por tudo que existe;

A minha família por me incentivar e apoiar em todos os momentos;

Ao Instituto de Biologia, a Comissão dos Estágios pelos Estágios Supervisionados e todos os cursos, palestras, aprendizados e motivação necessária;

Aos Professores Daniela I. B. Pereira e Ricardo B. Robaldo pela oportunidade do Estágio, pela orientação do TCC e das lições geradas;

A Msc. Deise Farias Freitas pelas fórmulas de estatística e dos conselhos;

Aos Farm. Bioq. Juliana Nunes Vieira e Fernando de Souza Maia Filho e a Prof^a Dra. Patrícia da Silva Nascente pela ajuda com os antibióticos;

Aos estagiários e professores do Laboratório de Ictiologia pelo fornecimento das amostras;

As Estagiárias Carolina Lambrecht Gonçalves, Júlia de Souza Silveira Valente e Franciele Elisa Stoll pela colaboração do Trabalho e amizade;

As Msc. Mara H. Saafeld, Anelise O. S. Fonseca e Michele G. Donatti e a todos os estagiários do Laboratório de Micologia pela amizade;

A todas as pessoas que participaram direto ou indiretamente neste trabalho e não citei nos agradecimentos peço minhas sinceras desculpas e sintam-se agradecidos.

E Muito Obrigada!

Resumo

CORRÊA, Bruna Ferraz. **Efeito *in vitro* de cloreto de sódio, iodeto de polivinilpirrolidona, formalina e permanganato de potássio no controle de *Saprolegnia* spp. em ovos de peixes-rei.** 2011. 37p. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A piscicultura é uma das atividades agrárias em expansão no mundo. No Rio Grande do Sul, é crescente a criação das espécies de peixes-rei *Odontesthes bonariensis* e *Odontesthes humensis*. A fim de aumentar a produtividade, os peixes são criados em tanques sob elevada aglomeração, o que aumenta a incidência de infecções, gerando perdas econômicas. Dentre as infecções, a saprolegniose é uma das mais frequentes. Para sua prevenção e controle usam-se substâncias químicas com atividade antimicrobiana, dentre eles formol, permanganato de potássio, iodóforos, cloreto de sódio, peróxido de hidrogênio. Diversos estudos mostraram a eficácia do formol, cloreto de sódio, permanganato de potássio e iodeto de polivinilpirrolidona (PVPI) *in vivo*. Os objetivos foram identificar os principais patógenos dos peixes-rei no sul do Rio Grande do Sul, testar diferentes químicos de ação antimicrobiana no controle de oomicetos e verificar se a fase micelial e infectante (zoósporo) apresentam diferenças de susceptibilidade aos compostos testados. Amostras de ovos dos peixes-rei e de águas de tanques infectados foram coletados de setembro de 2010 a agosto de 2011, totalizando 12 amostras. Os oomicetos isolados foram identificados morfológicamente e avaliada a susceptibilidade *in vitro* aos seguintes compostos: sal (puro, marinho e marinho iodado), formol, permanganato de potássio e PVPI. Todos os isolados foram identificados como *Saprolegnia* spp. Nos testes *in vitro* não foram observadas diferenças de susceptibilidade entre a fase micelial e infectante. Formol foi o composto que demonstrou maior inibição, seguido do permanganato de potássio, sal marinho iodado, sal marinho, sal puro e PVPI.

Palavras-chave: Aquicultura. *Odontesthes bonariensis*. *Odontesthes humensis*. Oomicetos. Patógenos. Químicos. Saprolegniales.

Abstract

CORRÊA, Bruna Ferraz. **Efeito *in vitro* de cloreto de sódio, iodeto de polivinilpirrolidona, formalina e permanganato de potássio no controle de *Saprolegnia* spp. em ovos de peixes-rei.** 2011. 37p. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Fish farming is an expansion of agricultural activities in the world. In Rio Grande do Sul, is increasing the creation of the species of silverside *Odontesthes bonariensis* e *Odontesthes humensis*. In order to increase productivity, fish are reared in tanks under high clustering, which increases the incidence of infections, causing economic losses. Among the infections, saprolegniosis is one of the most frequent. For prevention and control using chemical substances with antimicrobial activity, including formaldehyde, potassium permanganate, iodophors, sodium chloride, hydrogen peroxide. Several studies have shown the effectiveness of formaldehyde, sodium chloride, potassium permanganate and polyvinylpyrrolidone iodine (PVP) *in vivo*. The objectives were to identify the main pathogens of silverside in the south of Rio Grande do Sul, testing different chemical antimicrobial control of oomycetes and verify that the micelial phase and infectious (zoospores) showing differences in susceptibility to the compounds tested. Samples of eggs from silverside and infected water tank were collected from September 2010 to August 2011, totaling 12 samples. The oomycetes isolates were morphologically identified and evaluated *in vitro* susceptibility to the following compounds: salt (pure, marine and iodine marine), formaldehyde, potassium permanganate and PVP. All isolates were identified as *Saprolegnia* spp. On *in vitro* tests no differences were observed between the susceptibility and infectious mycelia phase. Formaldehyde was the composite demonstrated the highest inhibition, followed by potassium permanganate, iodized sea salt, sea salt, pure salt and PVP.

Keywords: Aquiculture. Chemicals. *Odontesthes bonariensis*. *Odontesthes humensis*. Oomycetes. Pathogens. Saprolegniales.

Lista de Figuras

Figura 1	Halo de crescimento de <i>Saprolegnia</i> spp. na análise de crescimento micelial com o químico sal marinho.....	19
Figura 2	Zoosporângio e zoósporos de <i>Saprolegnia</i> spp. em ovos de <i>Odontesthes humensis</i>	21
Figura 3	Gráfico da análise comparativa entre as médias das concentrações das formulações a base de NaCl em relação aos resultados de CIM testados. NaCl – cloreto de sódio; SM – sal marinho; SMI – sal marinho iodado; CIM – Concentração Inibitória Mínima.....	25

Lista de Tabelas

Tabela 1	Efeito de antimicrobianos em diferentes concentrações no crescimento micelial de <i>Saprolegnia</i> spp. isolada de água de cultivo de peixe-rei.....	24
Tabela 2	Efeito de antimicrobianos em diferentes concentrações no crescimento micelial de <i>Saprolegnia</i> spp. em ovos de <i>Odontesthes humensis</i>	24
Tabela 3	Efeito de antimicrobianos em diferentes concentrações no crescimento micelial de <i>Saprolegnia</i> spp. em ovos de <i>Odontesthes bonariensis</i>	24
Tabela 4	Susceptibilidade de zoósporos de <i>Saprolegnia</i> spp. frente aos compostos químicos testados.....	25
Tabela 5	Número de isolados de <i>Saprolegnia</i> spp. referente a susceptibilidade de zoósporos com suas respectivas CIM e CFM (ppm).....	26

Sumário

1. Introdução.....	10
1.1. Objetivos.....	11
1.1.1. Objetivo Geral.....	11
1.1.2. Objetivos Específicos.....	11
2. Revisão de Literatura.....	12
2.1. Piscicultura e Aquicultura.....	12
2.2. Peixes-rei (<i>Odontesthes</i> Evermann & Kendall, Atherinopsidae).....	12
2.3. Patologias ocasionadas por oomicetos.....	13
2.4. Controle dos oomicetos por meio de químicos	15
3. Material e Métodos.....	17
3.1. Isolamento dos oomicetos.....	17
3.2. Identificação dos oomicetos.....	17
3.3. Avaliação da suscetibilidade “<i>in vitro</i>” dos oomicetos isolados aos compostos cloreto de sódio marinho PA, cloreto de sódio marinho com iodo, cloreto de sódio marinho sem iodo, iodeto de polivinilpirrolidona (PVPI), formalina e permanganato de potássio.....	18
3.3.1. Concentrações dos compostos avaliados.....	18
3.3.2. Avaliação do Crescimento micelial.....	18
3.3.3. Susceptibilidade dos zoósporos.....	19
3.3.3.1. Preparação do Inóculo.....	19

3.3.3.2. Processamento da técnica.....	20
4. Resultados.....	21
4.1. Identificação dos oomicetos.....	21
4.2 .Efetividade dos químicos antimicrobianos.....	21
4.2.1. Avaliação do Crescimento Micelial.....	21
4.2.2. Susceptibilidade dos zoósporos.....	23
5. Discussão.....	26
6. Conclusões.....	30
7. Referências.....	31
8. Anexos.....	36

1. Introdução

A aquicultura e a piscicultura são duas atividades em expansão no mundo. No Rio Grande do Sul, é crescente a criação das espécies de peixes-rei *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes, 1835) e *Odontesthes humensis* (de Buen, 1953). Os piscicultores no intuito de aumentar sua produtividade aglomeram os peixes em tanques, aquários e açudes, o que provoca estresse, tornando-os suscetíveis a doenças. Dentre essas, destaca-se a saprolegniose causada por oomicetos. São descritos relatos de saprolegniose nos salmões coho *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum, 1792), e salmão do atlântico *Salmo salar* L., 1758, bem como na truta *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) no Chile (ZAROR et al, 2004); no peixe-rei *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes, 1835) na Argentina (MANCINI, et al., 2006, PACHECO-MARINO; STECIOW; PAUL, 2011), e inclusive em ovos (PACHECO-MARINO; STECIOW; BARBEITO, 2009)

Para prevenção e tratamento da saprolegniose usam-se químicos como: formol (MIFSUD; ROWLAND, 2008), cloreto de sódio (RASOWO; OKOTH; NGUGI, 2007), permanganato de potássio, iodeto de polivinilpirrolidona, bronopol (POTTINGER; DAY, 1999), peróxido de hidrogênio (MIFSUD; ROWLAND, 2008), óleos essenciais como o tomilho (TOLEDO et al., 2007), entre outros.

Alguns estudos demonstraram a eficácia da formalina, cloreto de sódio e permanganato de potássio, para controle da saprolegniose em truta *Salmo trutta* L., 1758 e bagre africano *Clarias gariepinus* Burchell, 1822 (RASOWO; OKOTH; NGUGI, 2007), e iodo na carpa comum *Cyprinus carpio* L., 1758 (KHODABANDEH; ABTAHI, 2006). No Brasil, é evidente a ocorrência de saprolegniose em peixes de água-doce e salobra de *Odonthestes bonariensis* e *Odonthestes humensis* (CONVERSA PESSOAL). Entretanto, na literatura não há relatos de saprolegniose em peixe-rei no sul do país e pesquisas que visem o controle da doença são desconhecidas. Desta forma, propõe-se o presente estudo que visa avaliar a susceptibilidade *in vitro* de *Saprolegnia* spp.. aos químicos de ação fungicida (formol, permanganato de potássio, sal marinho, sal marinho iodado, cloreto de sódio, iodeto de polivinilpirrolidona).

1.1. Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral foi Identificar os principais oomicetos patógenos de *Odontesthes bonariensis* e *Odontesthes humensis* para a piscicultura na região Sul do Rio Grande do Sul.

1.1.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos foram:

- Testar diferentes químicos de ação fungicida para o controle de oomicetos que afetam a aqüicultura;
- Verificar se a fase micelial e infectante (zoósporos) dos oomicetos isolados apresentam diferenças de susceptibilidade aos compostos testados.

2. Revisão de Literatura

2.1. Piscicultura e Aquicultura

Hoje em dia uma das formas de aumentar a disponibilidade de proteínas animais na dieta e combater a fome está na aquicultura a qual compreende uma larga variedade de animais e plantas tais como: peixes, crustáceos, moluscos, algas e outras plantas aquáticas (FAO, 2011). Ela engloba espécies de água doce, salgada e salobra. A aquicultura em todo o mundo é uma das indústrias de agricultura que está em expansão, com a produção em 2009 de 55.680.738 toneladas (FAO, 2011), onde a maior produção global está em países em desenvolvimento, principalmente na Ásia (WEST, 2006; BOYD et al., 2008). No Brasil, em 2009 a produção de pesca e aquicultura estiveram em 1.240.813 toneladas e a piscicultura teve uma elevação de 60,2% em 2008 e 2009 em comparação a 2007 (MPA, 2011).

No Rio Grande do Sul, duas espécies nativas que estão sendo trabalhadas em piscicultura são os peixes-rei *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes, 1835) e *Odontesthes humensis* (de Buen, 1953) (MARDINI, C.; MARDINI, L., 2000; ARTIOLI et al.; 2009), sendo importantes espécies comerciais de águas de regiões subtropicais da América do Sul (TSUZUKI et al., 2000).

2.2. Peixes-rei (*Odontesthes* Evermann & Kendall, Atherinopsidae)

Os *Odontesthes* é o gênero com mais espécies (19 reconhecidas) e mais ampla distribuição dentro de Atherinopsidae, em águas doces costais marinhas e drenagens de água doce temperadas da América do Sul (BRIAN, S.; DYER, H.; 2006). São conhecidos popularmente como peixe-rei (WHITE, 1985).

Dentro de *Odontesthes*, possuem duas espécies usadas em piscicultura no sul do Brasil que são *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes, 1835) e *Odontesthes humensis* (de Buen, 1953) (MARDINI, C.; MARDINI, L., 2000; ARTIOLI et al.; 2009).

Odontesthes bonariensis possui distribuição nos lagos e lagoas da Província de Buenos Aires, Argentina e no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. É uma espécie eurihalina, com 30 a 40 guelras na brânquia inferior. Espécimes desta espécie têm o mais longo registro de tamanho (52 cm largura) do que outros atherinopsídeos ou atheriniformes (BRIAN; DYER, 2006). Alimenta-se de moluscos, insetos, pequenos moluscos e algas. A reprodução ocorre entre maio e junho. As fêmeas podem desovar cerca de 16000 óvulos. Dependendo da temperatura o desenvolvimento embrionário pode demorar de 10 a 14 dias (MEGA; BEMVENUTI, 2006).

Odontesthes humensis está presente em lagos e corpos largos de água drenadas dos Rios La Plata e Uruguai, e nas Lagoas Mirim e dos Patos. Esta espécie é caracterizada por haver uma boca ventral, de 20 a 24 guelras curtas e espessas no membro inferior do primeiro arco, e dentes molariformes faríngeais que provêm de uma dieta bentônica, principalmente moluscos (BRIAN; DYER, 2006). Sua desova ocorre a partir de junho, preferencialmente em setembro. Apresenta maior número de indivíduos durante o inverno, caindo sua captura durante a primavera (MEGA; BEMVENUTI, 2006).

Os piscicultores podem aumentar sua produção inserindo mais peixes em tanques, aquários ou açudes e a aglomeração ocasiona estresse, tornando os animais mais suscetíveis a doenças (MEYER, 1991). Devido a isto, a prevenção das doenças em peixes é essencial para o sucesso da aquicultura. A maior causa de perdas econômicas em aquicultura se dá por doenças e as infecções por oomicetos são relevantes dentro deste panorama (MEYER, 1991; WEST, 2006).

2.3. Patologias ocasionadas por oomicetos

Alguns gêneros de oomicetos como *Saprolegnia* spp. e *Pythium* spp., são patógenos de plantas e animais, causando enormes prejuízos econômicos em ecossistemas naturais e cultivados (WEST, 2006). Estes pertencem ao Clado Stramenopila (YANONG, 2003; KE et al., 2009), Reino Protista (BRUNO; WOOD, 1999) por estar filogeneticamente mais próximos das algas. Taxonomicamente estão no Filo Oomycota, Classe Oomycetes e em três Subclasses: Saprolegniomycetidae, Rhipidiomycetidae e Peronosporomycetidae.

Grande parte dos patógenos de animais, principalmente os envolvidos em aquicultura pertencem a Subclasse Saprolegniomycetidae, a qual apresenta duas Ordens: Saprolegniales e Leptomitales. Os Saprolegniales incluem os três gêneros mais importantes para a aquicultura: *Saprolegnia* spp., *Achlya* spp. e *Aphanomyces* spp. (YANONG, 2003; WEST, 2006). Os oomicetos destes gêneros causam a saprolegniose (CHUKANHOM; HATAI, 2004; WEST, 2006), doença oportunista que acomete espécies dulciaquícolas e salobras (YANONG, 2003). Estruturas móveis e flageladas, conhecidas como zoósporos, são consideradas infectantes (KHOO, 2000; HUSSEIN; HATAI, 2002). Também pode ser observada em lagunas (ALI, 2005), e em ovos de peixes fertilizados ou não (SKAAR; STUELAND; HEIER, 2005, MOUSAVI et al., 2009).

A saprolegniose tipicamente é vista como massas de micélio branco, cinza, vermelho ou verde na pele ou brânquias de peixes, levando a morte por falência osmorregulatória (YANONG, 2003; ALI, 2005). Durante a incubação dos ovos produz micélio em ovos não fecundados que acaba por contaminar os saudáveis, sufocando-os e causando a morte (RASOWO, 2007; MOUSAVI et al., 2009). Nos peixes dulceaquícolas infectados provoca necroses dérmicas, assim, chegando à corrente sanguínea ocasiona morte por hemodiluição e falência osmorregulatória porque o peixe perde parte de sua “impermeabilidade” à água (WEST, 2006).

O ciclo de vida da Ordem Saprolegniales envolve duas fases: assexuada e sexuada. A reprodução é principalmente assexuada. Inicia-se dentro de um zoosporângio longo (hifa modificada) delimitado por septos. Zoósporos primários são liberados em um zoosporângio que nadam por um momento e depois se encistam. Cada um dá origem a um zoósporo secundário que se encista e germina para formar um novo micélio. Já a fase sexuada ocorre quando um mesmo micélio forma anterídios e oogônias. Na oogônia estão células ampliadas que a cada momento produzem oosferas haplóides. O anterídio se desenvolve na ponta de outros filamentos do mesmo indivíduo e produz núcleos masculinos. No micélio, o anterídio cresce perto da oogônia e forma expansões filamentosas denominadas tubo de fecundação que penetra na oogônia. O núcleo masculino passa por este tubo, encontra o núcleo feminino e ocorre a fecundação. A partir da fusão forma-se um zigoto de parede espessa (oósporo). Na germinação, o esporo desenvolve-se dentro

da hifa, que então produz o zoosporângio, começando o ciclo novamente. (ALEXOPOULOS, 1996; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

A identificação é baseada nas características morfológicas das estruturas reprodutivas assexuadas (zoósporos e zoosporângios) e estruturas sexuadas, como oogônia, anterídio, origem do anterídio e zoósporo (KE et al., 2009).

2.4. Controle dos oomicetos por meio de químicos

Os fungicidas tem sido eficazes para o controle de oomicetos. O principal destes, verde-malaquita, era usado para prevenção e tratamento de infecções causadas por oomicetos (SINHA; SRIVASTAVA; ROY, 2004; MIFSUD; ROWLAND, 2008). Entretanto, nas duas últimas décadas ele foi proibido devido a efeitos teratogênicos, residuais e carcinogênicos (MIFSUD; ROWLAND, 2008; MOUSAVI et al., 2009) .

Como forma de substituir o verde-malaquita, estão sendo utilizados outros químicos para controle, como a formalina (RASOWO; OKOTH; NGUGI, 2007; MIFSUD; ROWLAND, 2008), iodeto de polivinilpirrolidona (PVPI) (ARTHUR et al., 1996; POTTINGER; DAY, 1999), permanganato de potássio ($KMnO_4$) (ARTHUR et al., 1996; POTTINGER; DAY, 1999), cloreto de sódio (NaCl) (KHOMVILAI; KASHIWAGI; YOSHIOKA, 2005; RASOWO; OKOTH; NGUGI, 2007), bronopol (POTTINGER; DAY, 1999; SKAAR; STUELAND; HEIER, 2005), ácido acético (GAIKOWSKI; RACH; RAMSAY, 1999; KHOO, 2000), sulfato de cobre (CELADA et al., 2006; MIFSUD; ROWLAND, 2008), peróxido de hidrogênio (RASOWO; OKOTH; NGUGI, 2007; MIFSUD; ROWLAND, 2008), álcool isopropílico (CELADA et al., 2006) e azul de metileno (KHOO, 2000). Também foram testados óleos essenciais como o tomilho (TOLEDO et al., 2007), e o uso de quitosanas (quitosana metilpirrolidona, quitosana N-carboximetil e quitosana N-fosfonometil) (MUZZARELLI et al., 2001). Embora a ação desses compostos seja eficaz no controle de infecções por oomicetos, a sua utilização somente poderá ser feita em diferentes fases da produção do peixe como desinfetante ou como medida preventiva.

O sal é usado para tratamento profilático especialmente na aquacultura comercial, pois em altas concentrações é recomendado para tratamento efetivo (KHOO, 2000).

A formalina é uma solução aquosa saturada de formaldeído a 37%. O formaldeído é um composto químico extremamente reativo que interage com proteínas, DNA e RNA. É bactericida, esporocida, virucida e amplamente utilizado para tratamento de ectoparasitos e como potente fungicida (BRAVO et al., 2005). Normalmente é utilizado para tratamento de infecções fúngicas em ovos (GAIKOWSKI; RACH; RAMSAY, 1999; POTTINGER; DAY, 1999). Na maricultura somente é usado como desinfetante (ALDERMAN et al., 1994), devido a suspeita de ser carcinogênico e de causar efeitos adversos em ambientes aquáticos (CELADA et al., 2006; MIFSUD; ROWLAND, 2008).

O permanganato de potássio (KMnO_4) é um dos primeiros químicos a serem utilizados como quimioterápico no controle de doenças fúngicas, bacterianas e parasitárias na aquicultura (ARTHUR et al., 1996; YANONG, 2003). O efeito de inativação de patógenos pelo permanganato de potássio é a oxidação direta do material celular ou destruição de enzimas específicas. Devido a suspeita de ser mutagênico, ele não pode ser usado como tratamento em peixes para consumo humano (EPA, 1999).

Os iodóforos são complexos de iodo e um agente solubilizante o carrega, o qual atua como reserva de iodo livre. Ainda que a atividade germicida se mantenha, se considera que os iodóforos são menos ativos contra certos fungos e esporos que as tinturas. O iodóforo mais usado na aquicultura é o iodeto de polivinilpirrolidona (PVPI) (BRAVO et al., 2005) e tem sido usado para tratamento de ovos (CELADA et al., 2006) e contra vírus e bactérias exógenas (ALDERMAN et al., 1994).

3. Material e Métodos

3.1. Isolamento dos oomicetos

Amostras de ovos (*Odontesthes bonariensis* e *Odontesthes humensis*) infectados e de águas de aquários e tanques foram obtidos do Laboratório de Ictiologia (Departamento de Zootecnia - FAEM – UFPel). Foram coletadas, de setembro de 2010 a agosto de 2011, seis amostras de ovos e seis amostras de águas de tanques. As amostras de ovos foram coletadas durante o período de reprodução e desova do peixe-rei e as amostras de águas coletadas em períodos diferentes do ano (março, abril, junho, julho, agosto e setembro) tanto em incubadoras quanto em tanques com indivíduos adultos. Todas as amostras foram processadas no Laboratório de Micologia (Departamento de Microbiologia e Parasitologia - IB – UFPel). Primeiramente, as amostras de águas (volume de 200 mL) foram incubadas em estufa bacteriológica com sementes de gergelim (*Sesamum indicum* L.) de 2 a 5 dias. Posteriormente as sementes foram coletadas e semeadas em placas de Petri contendo o meio de cultura Ágar Levedura¹. As amostras de ovos foram semeadas no mesmo meio de cultura descrito anteriormente. Todas as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a temperatura ambiente (25°C), durante 1 a 3 dias. As colônias suspeitas foram repicadas para placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura e após crescimento foram submetidas à identificação.

3.2. Identificação dos oomicetos

A identificação dos oomicetos isolados foi realizada através da morfologia das hifas e das características de estruturas de reprodução assexuada. Para isto foi feita a metodologia da zoosporogênese descrita por Mendoza e Prendas (1988). Pequenos blocos de ágar dos cultivos a serem identificados foram repicados para placas de Petri contendo ágar CMA (*Corn Meal Agar*: água: 1000mL: Ágar: 17g, farinha de milho: 20g). Fragmentos de folhas de capim-forquilha (*Paspalum notatum* Fluegge) cortados em 3cm² ou sementes de gergelim (*Sesamum indicum* L.)

¹ Ágar Levedura composto por 1000mL: extrato de levedura: 2g, Agar: 20g, acrescido de antibiótico (estreptomomicina ou cefalexina: 0,5g em 1000mL de água).

previamente autoclavados a 121^oC por 30 minutos, foram distribuídos na superfície do ágar. As placas foram incubadas por um período de 1 a 3 dias a 37^oC. Os substratos infectados foram transferidos para placas de Petri contendo 30 mL de meio de indução (ver Anexos). Estas placas foram incubadas a 37^oC, durante 6h. Durante esse período, os substratos foram regularmente observados, através de microscopia ótica entre lâmina e lamínula para identificação dos zoosporângios e zoósporos. A identificação dos oomicetos foi baseada em Alexopoulos (1996), Daugherty (1998) e Yanong (2003) e feita até o menor nível taxonômico possível.

3.3. Avaliação da susceptibilidade “*in vitro*” dos oomicetos isolados

Para a avaliação da susceptibilidade *in vitro* dos oomicetos frente aos diferentes compostos: cloreto de sódio marinho PA, cloreto de sódio marinho com iodo, cloreto de sódio marinho sem iodo, iodeto de polivinilpirrolidona (PVPI), formalina e permanganato de potássio foram usadas duas metodologias: a primeira que avaliou a influência no crescimento micelial e a segunda que avaliou a susceptibilidade dos zoósporos.

3.3.1 Concentrações dos compostos avaliados

Foram utilizadas as concentrações seriadas em 0 (controle), 10, 50, 100, 1000, 5000 e 10000ppm para avaliação do crescimento micelial. Já para a avaliação da susceptibilidade dos zoósporos devido a técnica possuir resultados absolutos as concentrações foram 10, 50, 100, 250, 750, 1000, 2500, 5000, 7500, 10000, 12500, 15000, 17500, 20000, 22500 e 25000ppm.

3.3.2. Avaliação do crescimento micelial

Para avaliação do crescimento micelial, as respectivas concentrações dos químicos a serem testados foram misturadas a 20mL de agar levedura a 45^oC. Após homogeneização o agar foi vertido em placas de Petri de 85mm. Após a solidificação do agar, um disco de 9mm de diâmetro de cultivo do oomiceto a ser testado foi semeado na posição central da placa, sendo incubada em estufa bacteriológica a 25^oC, durante 4 dias (adaptado e modificado de Meinelt et al., 2007). O controle positivo utilizado foi o oomiceto repicado no Agar, sem adição de químicos e o controle negativo foi somente o agar homogeneizado com o químico nas

concentrações citadas anteriormente (3.3.1.) sem o cultivo. As amostras foram observadas diariamente. A cada dia, durante 4 dias, o crescimento foi avaliado por meio da medida do diâmetro do halo de crescimento (Fig. 1). Os dados foram anotados e foi calculado o Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (ICMV) (OLIVEIRA, 1991) (ver Anexos), baseado na velocidade de crescimento do micélio por dia. Determinado o ICMV, foi feito o teste estatístico de ANOVA, seguido do teste de diferença de médias de Tukey, sob nível de significância de 5%.

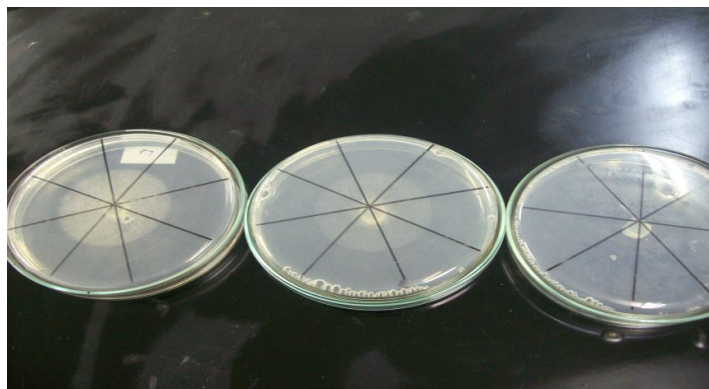


Figura 1 – Halo de crescimento de *Saprolegnia* spp. na análise de crescimento micelial com o químico sal marinho.

3.3.3. Susceptibilidade dos zoósporos

A avaliação da susceptibilidade dos zoósporos utilizou a macrodiluição em caldo seguindo o protocolo internacional M38 – A₂ (2008) determinado pelo CLSI (Clinical Laboratory and Standards Institute) e adaptada para teste *in vitro* com *Pythium insidiosum* (Pereira et al., 2007).

3.3.3.1. Preparação do inoculo

O inoculo foi obtido pela metodologia de zoosporogênese (conforme descrito no item 2.2). Após observação da formação de zoosporângios e liberação dos zoósporos, realizou-se a contagem de zoósporos livres no meio de indução, utilizando-se hemocitômetro de Neübauer. O inoculo utilizado continha entre 20.000 – 30.000 zoósporos/mL.

3.3.3.2. Processamento da técnica

Os compostos a ser testados foram previamente preparados nas diferentes concentrações de 10, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 2500, 5000, 7500, 10000, 12500, 15000, 17500, 20000, 22500 e 25000ppm no caldo Sabouraud dextrose (1000mL: Peptona: 10g, Dextrose: 40g). Realizou-se a transferência de 100µL do inóculo para tubos de hemólise. Em cada tubo se acrescentou 900µL do caldo Sabouraud com o químico. Todos os testes foram realizados em duplicata. Como controle positivo utilizou-se 100µL de inóculo e 900µL de caldo. Como controle negativo utilizou-se 1000µL de caldo mais a concentração do químico para o teste que foram de 10 a 25000ppm. Todos os tubos foram incubados a 37⁰C por 24 h. A leitura levou em consideração o crescimento ou não de hifas, com a presença de micélio branco no caldo visualizada contra a luz, sendo identificada a concentração inibitória mínima (CIM), ou seja, a menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento do microrganismo. As concentrações acima da CIM foram utilizadas para determinação da concentração fungicida mínima (CFM). Para isto, foi repicado 100µL da diluição para tubos contendo 900µL de caldo Sabouraud, ficando incubados a 37⁰C por 24 h. A menor concentração da droga que não evidenciou crescimento, ou seja, sem a presença de micélio branco no caldo, foi considerada a CFM.

4. Resultados

4.1. Identificação dos oomicetos

Das amostras de ovos coletados (n=6) foram isolados oomicetos do gênero *Saprolegnia* spp. (fig. 2).

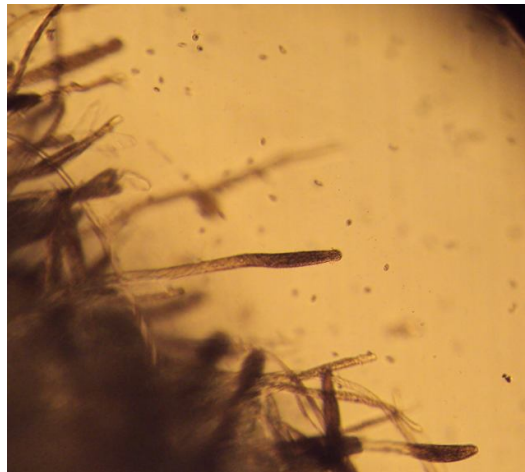


Figura 2 - Zoosporângio e zoósporos de *Saprolegnia* spp. em ovos de *Odontesthes humensis*.

Das seis amostras de águas de tanque infectadas analisadas, isolou-se oomicetos do gênero *Saprolegnia* spp.

4.2. Efetividade dos químicos antimicrobianos

4.2.1. Avaliação do crescimento micelial

Das amostras de *Saprolegnia* spp. isoladas das águas e dos ovos (n=12), o químico que mostrou maior ação antimicrobiana foi a formalina, com concentrações a partir de 10ppm, seguido do permanganato de potássio, que induziu inibição do crescimento micelial em concentrações a partir de 1000ppm. Observou-se que os sais (cloreto de sódio puro, sal marinho e sal marinho acrescido de iodo) apresentaram a menor atividade antimicrobiana com valores de atividade em torno de 5000ppm. Os dados referentes ao crescimento micelial são apresentados na tabela 1, 2 e 3.

Tabela 1 - Efeito de antimicrobianos em diferentes concentrações no crescimento micelial de *Saprolegnia* spp. isolada de água de cultivo de peixe-rei.

Antimicrobiano	Concentrações (ppm)						
	0	10	50	100	1000	5000	10000
Sal Marinho	1,98± 0,71 A	1,65 ± 0,92 A	1,72 ± 0,90 A	1,80 ± 1,10 A	1,89 ± 0,87 A	1,63 ± 1,07 A	1,16 ±1,03 A
Sal Marinho Iodado	2,12 ± 0,71 A	1,79 ± 0,68 A	1,76 ± 0,67 A	1,56 ± 0,85 A	1,89 ± 1,02 A	1,12 ± 1,10 A	1,42 ±1,58 A
Cloreto de sódio	1,56 ± 0,92 A	1,75 ± 1,00 A	1,76 ± 0,67 A	1,77 ± 0,75 A	1,62 ± 0,59 A	1,53 ± 0,96 A	1,15 ± 1,00A
Permanganato de potássio	1,82 ± 0,75 A	2,02 ± 0,83 A	2,14 ± 0,64 A	1,57 ± 1,04 A	0,62±0,65 ab	0,12±0,18 ab	0,20±0,18 ab
Formalina Iodeto de polivinilpirrolidona	1,82 ± 0,78 A	0,18 ± 0,45 ab	0,21±0,45 ab	0,19±0,44 ab	0 ± 0 ab	0 ± 0 ab	0 ± 0 ab
	2,34 ± 1,02 A	1,75 ± 1,29 A	1,74 ± 1,31 A	1,50 ± 1,15 A	1,87 ± 0,99 A	1,84 ± 1,26 A	0,42 ±0,75A

Letras minúsculas representam diferenças significativas entre as médias na mesma linha. Letras maiúsculas não representam diferenças significativas entre as médias da coluna. Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre as médias da coluna.

Tabela 2 - Efeito de antimicrobianos em diferentes concentrações no crescimento micelial de *Saprolegnia* spp. em ovos de *Odontesthes humensis*.

Antimicrobiano	Concentração (ppm)						
	0	10	50	100	1000	5000	10000
Sal Marinho	2,11± 0,90 A	2,17 ± 0,78 A	2,14± 0,81 A	2,13 ±0,96 A	2,23 ±1,04 A	1,90 ± 1,64 A	1,87 ±1,60 A
Sal Marinho Iodado	2,53 ± 0,44 A	2,83 ± 0,32 A	2,82 ± 0,03 A	2,90 ±0,03 A	2,32 ±1,10 A	2,88 ± 0,01 A	2,78 ±0,19 A
Cloreto de sódio	2,28 ± 1,09 A	2,13 ± 0,73 A	2,29 ± 0,98 A	2,33 ±1,19 A	2,16 ±1,24 A	2,01 ±1,41 A	1,48 ±1,60 A
Permanganato de potássio	1,38 ± 0,80 A	2,39 ± 0,4 A	2,48± 0,19 A	1,07 ±0,73 A	0,12±0,20ab	0,09±0,16ab	0± 0 ab
Formalina Iodeto de polivinilpirrolidona	1,48 ± 0,83 A	0 ± 0 ab	0± 0 ab	0 ±0 ab	0 ±0 ab	0 ±0 ab	0± 0 ab
	2,53 ± 0,44 A	2,77 ± 0,17 A	3,05 ± 0,19 A	2,11 ±1,03 A	2,80 ±0,25 A	2,77 ±0,14 A	1,21 ±1,47 A

Letras minúsculas representam diferenças significativas entre as médias na mesma linha. Letras maiúsculas não representam diferenças significativas entre as médias da coluna. Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre as médias da coluna.

Tabela 3 - Efeito de antimicrobianos em diferentes concentrações no crescimento micelial de *Saprolegnia* spp. em ovos de *Odontesthes bonariensis*:

Antimicrobiano	Concentração (ppm)						
	0	10	50	100	1000	5000	10000
Sal Marinho	3,06±0,27 A	2,99 ±0,49 A	2,41 ±1,27 A	3,13 ± 0,18 A	3,01 ± 0,47 A	2,37 ±1,25 A	2,60 ±0,33 A
Sal Marinho Iodado	2,64±0,23 A	2,69 ±0,47 A	2,67 ±0,39 A	2,61 ±0,22 A	2,7 ±0,38 A	2,56 ±0,34 A	2,38±0,38 A
Cloreto de sódio	2,39±0,23 A	2,44 ±0,33 A	2,16 ±0,12 A	2,14 ± 0,12 A	2,19 ±0,14 A	2,08 ±0,19 A	2,36 ±0,07 A
Permanganato de Potássio	2,51± 0,15 A	2,51±0,13 A	2,27±0,42 A	2,6±0,07 A	0,29±0,37ab	0,03±0,04ab	0 ±0 ab
Formalina	2,51±0,16 A	0,38±0,42 ab	0,72±0,64 ab	0,27±0,47ab	0 ±0 ab	0 ±0 ab	0 ±0 ab
Iodeto de polivinilpirrolidona	2,51 ±0,16 A	2,57 ±0,26 A	2,67 ±0,22 A	2,55 ±0,23 A	2,68 ± 0,11 A	2,61±0,03 A	2,87 ±0,34 A

Letras minúsculas representam diferenças significativas entre as médias na mesma linha. Letras maiúsculas não representam diferenças significativas entre as médias da coluna. Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre as médias da coluna.

4.2.2. Susceptibilidade dos zoósporos

A susceptibilidade *in vitro* de zoósporos de seis amostras de *Saprolegnia* spp. isoladas de água de cultivo de peixe-rei está discriminada na tabela 4 e 5. Os resultados obtidos indicam que a susceptibilidade dos zoósporos aos compostos testados ocorreu nesta ordem de eficácia: formol, permanganato de potássio, sal marinho iodado, sal marinho, cloreto de sódio e PVPI.

Na figura 3 compara-se a atividade antimicrobiana das formulações a base de cloreto de sódio. É possível evidenciar-se nas médias dos MIC diferenças de eficácia, sendo o sal marinho iodado superior ao sal marinho e cloreto de sódio.

Tabela 4 - Susceptibilidade de zoósporos de *Saprolegnia* spp. frente aos compostos químicos testados.

Amostra	Produto											
	SM		SMI		NaCl		KMnO ₄		Formol		PVPI	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
001	15000	20000	1000	1000	15000	15000	5000	5000	10	10	15000	15000
002	1000	1000	500	500	5000	10000	750	750	10	10	20000	20000
003	15000	20000	1000	1000	15000	15000	1000	1000	10	10	20000	20000
004	10000	15000	10000	20000	15000	15000	1000	7500	10	10	20000	20000
005	12500	12500	20000	22500	10000	10000	1000	1000	10	10	25000	25000
006	22500	22500	12500	12500	12500	12500	1000	5000	10	10	12500	12500

CIM – Concentração Inibitória Mínima; CFM – Concentração Fungicida Mínima; SM – sal marinho; SMI – sal marinho iodado; NaCl – cloreto de sódio; KMnO₄ - permanganato de potássio; PVPI – iodeto de polivinilpirrolidona.

Tabela 5 – Número de isolados de *Saprolegnia* spp. referente a susceptibilidade de zoósporos com suas respectivas CIM e CFM (ppm)

Concentrações (ppm)	SM		SMI		NaCl		KMnO ₄		Formol		PVPI	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
10	0	0	0	0	0	0	0	0	6	6	0	0
500	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
750	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
1000	1	1	2	2	0	0	4	2	0	0	0	0
5000	0	0	0	0	1	0	1	2	0	0	0	0
7500	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
10000	1	0	1	0	1	2	0	0	0	0	0	0
12500	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1
15000	2	1	0	0	3	3	0	0	0	0	1	1
20000	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	3	3
22500	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
25000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
MG CIM	9265,72		3282,1		7715,42		1246,44		10		18295,26	
MG CFM	10941,24		3757,07		12711,51		2280,4		10		18295,26	

CIM – Concentração Inibitória Mínima; CFM – Concentração Fungicida Mínima; SM – sal marinho; SMI – sal marinho iodado; NaCl – cloreto de sódio; KMnO₄ - permanganato de potássio; PVPI – iodeto de polivinilpirrolidona; MG – Média Geométrica.

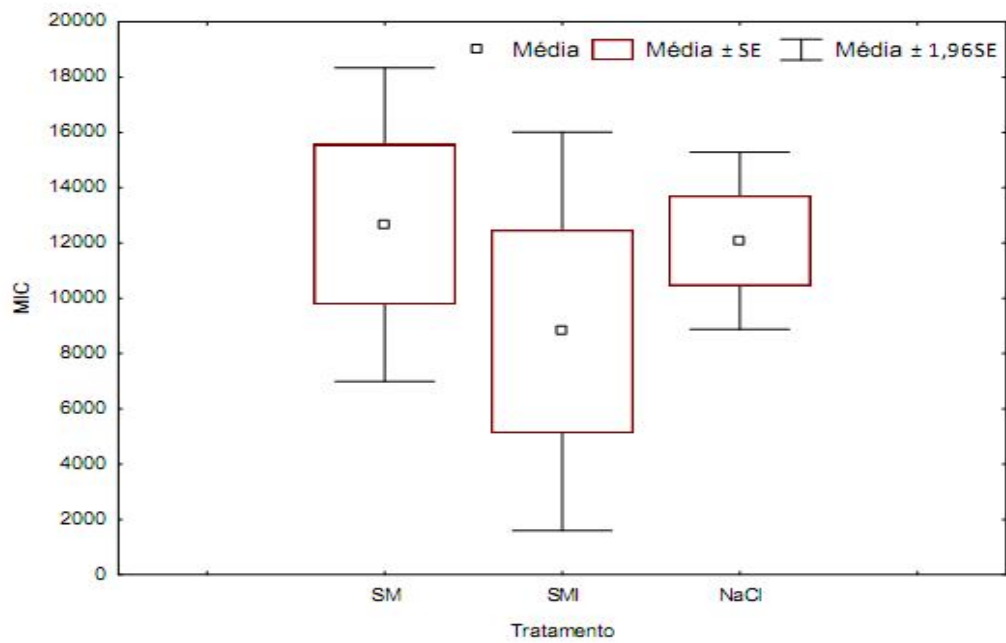


Figura 3 – Gráfico da análise comparativa entre as médias das concentrações das formulações a base de NaCl em relação aos resultados de MIC testados. NaCl – cloreto de sódio; SM – sal marinho; SMI – sal marinho iodado; MIC – Concentração Inibitória Mínima

5. Discussão

Oomicetos da Família Saprolegniaceae são ubíquos em abastecimentos de água. Perdas devido à saprolegniose em peixes são relatadas em diferentes partes do mundo afetando salmão do atlântico *Salmo salar* L., 1758 (NOBLE; SUMMERFELT, 1996; ZAROR et al, 2004), truta *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) (SCHREIER; RACH; HOWE, 1996; POTTINGER; DAY, 1999; ZAROR et al. 2004), carpa comum *Cyprinus carpio* L., 1758 (KHODABANDEH; ABTAHI, 2006), salmão congelado coho *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum, 1792) (ZAROR et al. 2004), silver perch *Bidyanus bidyanus* (Mitchell, 1838) (MIFSUD; ROWLAND, 2008) e bagre africano *Clarias gariepinus* Burchell, 1822 (RASOWO; OKOTH; NGUGI, 2007). No Brasil, Martins et al (2002) citam a ocorrência de saprolegniose em peixes de água doce das espécies pacu comum (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg), piavuçu (*Leporinus macrocephalus*), tambacu híbrido e *Oreochromis niloticus* no estado de São Paulo. No presente estudo *Saprolegnia* spp. foi isolada de amostras de ovos de *Odontheistes bonariensis* e *Odontheistes humensis* e de água de tanques coletadas de um sistema de produção experimental de peixes no sul do Rio Grande do Sul. Esses achados evidenciam a ocorrência de saprolegniose em peixes de água doce neste Estado e justificam a procura por métodos de controle da enfermidade no intuito de reduzir as perdas causadas pela infecção.

Vários estudos têm avaliado a eficácia *in vivo* de diferentes produtos, entre eles, formalina, cloreto de sódio, permanganato de potássio e iodo para controle da saprolegniose em diversas espécies de peixes (RASOWO; OKOTH; NGUGI, 2007; KHODABANDEH; ABTAHI, 2006). Entretanto *in vitro* possuem poucos trabalhos com cloreto de sódio e iodeto de polivinilpirrolidona (FUANGSAWAT; ABKING; LAWHAVINIT, 2011).

O formol (formalina) é uma solução aquosa saturada de formaldeído a 37%. É amplamente utilizada para o tratamento de ectoparasitos e como potente fungicida no mundo inteiro (BRAVO, et al.; 2005). Nos testes de susceptibilidade *in vitro* realizados no presente estudo observou-se que o formol causou inibição do crescimento de todos os isolados de *Saprolegnia* spp. em concentrações de 10ppm.

Resultados similares foram relatados por Pacheco-Marino e Salibian (2010). Estes autores afirmam que o formol pode ser utilizado em concentrações de até 530ppm, sem quaisquer danos para ovos de peixe-rei. Todavia, embora o formol apresente atividade inibitória em baixas concentrações e, em ambientes aquáticos apresente pouca toxicidade com meia-vida de um a dez dias (Green Living Tips, 2011), pesquisas avaliando o efeito de bioacumulação em camundongos, demonstraram que concentrações de 3, 6 e 12ppm em carne de peixe produziram degeneração e necrose de hepatócitos, respectivamente. Estes dados mostram que o formol não pode ser utilizado no tratamento efetivo de peixes destinados para consumo humano, mas somente para prevenção de saprolegniose em ovos (MURTINI; PUSPITASARI; SUMARNY, 2009).

Os resultados com permanganato de potássio evidenciaram significativa inibição do crescimento micelial, assim como de zoósporos, em concentrações a partir de 1000ppm. Esses resultados diferem de estudos *in vivo*, que utilizam concentrações a partir de 2ppm para tratamento de ovos de truta (RASOWO; OKOTH; NGUGI, 2007) e tratamento efetivo de adultos de tilápia (*Tilapia nilótica* L.) infectados com *Saprolegnia parasitica* (ZAKI; FAWZI; EL-JACKEY, 2008). Sugere-se que essas diferenças podem ser decorrentes de fatores como temperatura e pH, inerentes aos meios de cultura utilizados para os testes *in vitro*, que podem interferir na liberação de dióxido de manganês, princípio ativo de oxidação celular (EPA, 1999). O efeito do permanganato de potássio no controle de saprolegniose é considerado eficaz, pois provoca forte oxidação do material celular. O produto não possui substâncias suspeitas de bioacumulação, porém é muito tóxico em ambientes aquáticos, uma vez que pode causar efeitos adversos de longo tempo, assim como: efeitos mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos (EPA, 1999). Por estas razões e por segurança, aconselha-se utilizá-lo somente para tratamento em ovos.

Ao testar a inibição do crescimento micelial com iodeto de polivinilpirrolidona (10% iodo) observou-se que não houve diferença significativa em nenhuma das concentrações estudadas. Já quando avaliada a susceptibilidade dos zoósporos identificou-se que a média geométrica, tanto da CIM como da CFM, foi de 18.295,26 ppm. Estes achados evidenciam a baixa eficácia deste composto na inibição de *Saprolegnia* spp. Pesquisas prévias utilizando PVPI na inibição do crescimento micelial de *Saprolegnia* spp., *Achyla* spp. e *Aphanomyces* spp. evidenciaram CIM e CFM de 3100 e

6300ppm, respectivamente (FUANGSAWAT; ABKING; LAWHAVINIT, 2011) muito abaixo das encontradas no presente trabalho. A ação antimicrobiana do iodo é rápida, porém o mecanismo exato de ação não é conhecido. Nos microrganismos, o iodo interfere com as proteínas, em particular aquelas que possuem grupos livres de aminoácidos cisteína e metionina, nucleotídeos e ácidos graxos, que culmina com a morte celular. O PVPI é um iodóforo eficaz como germicida, porém, com menor atividade antimicrobiana contra certos fungos e esporos, quando comparado às tinturas de iodo (BRAVO, et al.; 2005). A baixa eficácia observada neste estudo pode ser decorrente da menor atividade desta formulação de iodo. Desta forma, experimentos avaliando tinturas de iodo na inibição do crescimento de *Saprolegnia* spp. *in vitro* necessitam ser realizados.

Dentre os compostos de sódio testados, observou-se que não houve diferença significativa na inibição do crescimento micelial entre os sais. Entretanto, ao avaliar-se a susceptibilidade dos zoósporos pela técnica de macrodiluição em caldo verificou-se que o sal marinho iodado apresentou médias geométricas de CIM e CFM (3282,10 e 3757,07, respectivamente), seguido do sal marinho (média geométrica de CIM: 9265,72 e CFM: 10911,24) e do cloreto de sódio (média geométrica de CIM: 7715,42 e CFM: 12711,51). Resultados similares foram relatados por Fuangswat, Abking e Lawhavit (2011) ao estudar os efeitos *in vitro* de cloreto de sódio, peróxido de hidrogênio, ácido acético e iodeto de polivinilpirrolidona em amostras de oomicetos. As diferenças de eficácia encontradas entre o sal marinho iodado, sal marinho e cloreto de sódio podem ser explicadas pela composição química dos sais que diferem entre si. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO; ICCIDD; UNICEF, 1996) recomenda-se a adição de 20-40ppm de iodo ou 34-66ppm de iodeto de potássio, entretanto em alguns países recomendam concentrações menores: 100ppm nos Estados Unidos e menores como 15ppm na Suíça a fim de prevenir o bócio (CARPENTER, 2005). Acredita-se que a presença de iodo, amplamente conhecido como agente antimicrobiano, aumente a eficácia deste tipo de sal, sendo responsável pelos melhores resultados observados (BRAVO et al., 2005). Entretanto, mesmo que o cloreto de sódio tenha demonstrado menor eficácia, para a prevenção de saprolegnose em ovos do peixe-rei *Odontesthes bonariensis*, sugere-se que este composto possa ser utilizado nas concentrações fungicidas encontradas no presente

estudo (12g/L), uma vez que está abaixo daquelas consideradas tóxicas (28,68g/L) (PACHECO-MARINO; SALIBIAN, 2010).

Neste trabalho, além de avaliar-se a inibição do crescimento micelial de 12 amostras de *Saprolegnia* spp., também avaliou-se a susceptibilidade de zoósporos de seis amostras oriundas de água, no intuito de verificar possíveis diferenças de susceptibilidade entre a fase micelial e formas infectantes do oomiceto. Os resultados obtidos permitem inferir que não houve diferença entre as duas fases do oomiceto, uma vez que as concentrações inibitórias aos compostos avaliados se mantiveram similares, com exceção do sal marinho iodado. Esta discrepância pode ser atribuída à metodologia das técnicas utilizadas que diferem entre si.

Acredita-se que este trabalho é o primeiro a utilizar a técnica de macrodiluição em caldo, preconizada pelo CLSI, para avaliar a susceptibilidade de zoósporos de *Saprolegnia* spp. A vantagem desta técnica sobre a metodologia que mede a inibição do crescimento micelial é a praticidade de realização, rapidez, facilidade e segurança em se identificar os valores de CIM e CFM. Todavia, como não há diferença de susceptibilidade, a escolha da técnica a ser adotada ficará a critério do pesquisador.

6. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir:

Saprolegnia spp. é o principal oomiceto patógeno de *Odontesthes bonariensis* e *Odontesthes humensis* cultivados na região sul do Rio Grande do Sul;

O formol inibe o crescimento de *Saprolegnia* spp. em concentrações de 10ppm, seguido do permanganato de potássio em concentrações a partir de 1000ppm;

Dentre as formulações a base de cloreto de sódio, o sal marinho iodado é mais eficaz na inibição de *Saprolegnia* spp. que o sal marinho e cloreto de sódio;

O PVPI apresenta baixa eficácia na inibição de *Saprolegnia* spp., evidenciando CIM e CFM acima de 18000ppm;

Não há diferença na susceptibilidade entre fase micelial e infectante (zoósporos) de *Saprolegnia* spp.

7. Referências

ALDERMAN, D. J.; ROSENTHAL, H.; SMITH, P.; STEWART, J. WESTON, D. **Chemicals Used In Mariculture**. Dinamarca: International Council for the Exploration of the Sea, 1994.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. Phylum Oomycota. In: **Introductory Mycology**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1996, p. 683-737..

ALI, E. H. Morphological and biochemical alterations of oomycete fish pathogen *Saprolegnia parasitica* as affected by salinity, ascorbic acid and their synergistic action. **Mycopathologia**, Egito, v.159, n. 1, p. 231-243, 2005.

ARTHUR, J.R.; LAVILLA-PITOGO, C.R.; SUBASUNGHE, R.P. **Use of Chemicals in Aquaculture in Asia**: Proceedings of the Meeting of the Use of Chemicals in Aquaculture in Asia. Tigbuan: Southeast Asian Fisheries Development Center Aquaculture Department, 1996, 244p.

ARTIOLI, L. G. S.; VIEIRA, J. P.; GARCIA, A. M.; BEMVENUTI, M. de A. Distribuição, dominância e estrutura de tamanhos da assembléia de peixes da lagoa Mangueira, sul do Brasil. **Iheringia. Série Zoologia**, Porto Alegre, v. 99, n. 4, p. 409-418, 2009.

BOYD, C. E. et al. **Best Management Practices for Responsible Aquaculture**. Alabana: United States Agency for Internacional Development, 2008. 47p.

BRAVO, S. et al. **Diagnostico del uso de Fármacos y otros productos químicos en la Acuicultura**. Puerto Montt, Chile. Universidad Austral de Chile, 2005. 256p.

BRIAN, S.; DYER, H. Systematic revision of the South American silversides (Teleostei, Atheriniformes). **Biocell**, v. 30, n. 1, p. 69-88, 2006.

BRUNO, D.W.; WOOD, B.P. Saprolegnia and other Oomycetes. In: **Fish Diseases and Disorders, Volume 3, Viral, Bacterial and Fungal Infections**. Wallingford: CABI Publishing, 1994.p. 599-659.

CARPENTER, K. J. David Marine and the Problem of Goiter. **The Journal of Nutrition**, v. 135, n. 1, p. 675-680, 2005.

CELADA, J.D.; MELENDRE, P.M.; CARRAL, J.M.; SÁEZ-ROYUELA, M.; AGUILERA, A. Effectiveness of antifungal treatments during artificial incubation of the signal crayfish eggs (*Pacifastacus leniusculus* Dana. Astacidae). **Aquaculture**, v. 257, n. 1, p. 257-265, 2006.

CHUKANHOM, K.; HATAI, K. Freshwater fungi isolated from eggs of the common carp (*Cyprinus carpio*) in Thailand. **Mycoscience**, v. 45, n. 1, p. 42–48, 2004.

DAUGHERTY, J.; EVANS, T. M.; SKILLOM, T.; WATSON, L. E.; MONEY, N. P. Evolution of Spore Release Mechanisms in the Saprolegniaceae (Oomycetes): Evidence from a Phylogenetic Analysis of Internal Transcribed Spacer Sequences. **Fungal Genetics and Biology**, v. 24, n.1, p. 354–363, 1998.

EPA Guidance Manual. **Alternative Disinfectants and oxidants**. Cap. 5: Potassium Permanganate, 1999, 15 p.

Food and Agriculture Organization of the United Nations: Fishery Resources. Disponível em: < <http://www.fao.org/fishery/topic/2681/en>>. Acesso em: 27 set 2011.

Food and Agriculture Organization of the United Nations: Yearbooks of Fishery Statistics - Summary tables of Fishery Statistics - Capture - Aquaculture – Commodities. Disponível em: < ftp://ftp.fao.org/FI/STAT/SUMM_TAB.HTM>. Acesso em: 27 set 2011.

FUANGSAWAT, W.; ABKING, N.; LAWHAVINIT, O-A. Sensitivity Comparison of Pathogenic Aquatic Fungal Hyphae to Sodium Chloride, Hydrogen Peroxide, Acetic Acid and Povidone Iodine. **Kasetsart Journal of Natural Science**, v. 45, n. 1, p. 84 – 89, 2011.

GAIKOWSKI, M. P.; RACH, J. J.; RAMSAY, R. T. Acute toxicity of hydrogen peroxide treatments to selected lifestages of cold-, cool-, and warmwater fish. **Aquaculture**, v. 178, n. 1, p. 191-207, 1999.

Green Living Tips. Disponível em: <<http://www.greenlivingtips.com/articles/62/1/Toxic-formaldehyde.html>>. Acesso em: 13 out 2011.

HUSSEIN, M. M. A.; HATAI, K. Pathogenicity of *Saprolegnia* species associated with outbreaks of salmonid saprolegniosis in Japan. **Fisheries Science**, v. 68, n. 1, p.1067-1072, 2002.

KE, X.; WANG, J.; GU, Z.; LI, M.; GONG, X. *Saprolegnia brachydanis*, A New Oomycete Isolated from Zebra Fish. **Mycopathologia**, v. 167, n. 1, p. 107–113, 2009.

KHODABANDEH, S.; ABTAHI, B. Effect of sodium chloride, formalin and iodine on the hatching success of common carp, *Cyprinus carpio*, eggs. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 22, n. 1, p. 54–56, 2006.

KHOMVILAI, C.; KASHIWAGI, M.; YOSHIOKA, M. Fungicidal Efficacy of Sodium Hypochlorite of a Fish-Pathogen Oomycetes, *Saprolegnia diclina* from Thailand. **Bulletin of the Faculty of Bioresources, Mie University**, Japan, v. 1, n. 32, p. 39-44, 2005.

KHOO, L. Fungal Diseases in Fish. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 9, n. 2, p. 102-111, 2000.

MANCINI, M.; RODRIGUEZ, C.; PROSPERI, C.; SALINAS, V.; BUCCO. Main diseases of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) in central Argentina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26 n. 4 p. 205-210, 2006.

MARDINI, C. V.; MARDINI, L. B. L. F. **Cultivo de Peixes**. Canoas: Ulbra, 2000. 204p.

MARTINS, M. L.; ONAKA, E. M.; MORAES, F. R. de; BOZZO, F. R.; PAIVA, A. M. F. C.; GONÇALVES, A. Recent studies on parasitic infections of freshwater cultivated fish in the state of São Paulo, Brazil. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 4, p. 981-985, 2002.

MEGA, D. F.; BEMVENUTI, M. A. Guia Didático sobre alguns peixes da Lagoa Mangueira, RS. **Cadernos de Ecologia Aquática**, v. 1, n. 2, p. 1-15, 2006.

MEINELT, T.; PAUL, A.; PHAN, T. M.; ZWIRNMANN, E.; KRÜGER, A.; WIENKE, A.; STEINBERG, C. E. W. Reduction in vegetative growth of the water mold *Saprolegnia parasitica* (Coker) by humic substance of different qualities. **Aquatic Toxicology**, v. 83, n. 1, p. 93–103, 2007.

MENDOZA, L.; PRENDAS, J. A method to obtain rapid zoosporogenesis of *Pythium insidiosum*. **Mycopathologia**, v. 104, n. 1, p. 59-62, 1988.

MEYER, F.P. Aquaculture disease and health management. **Journal of Animal Science**, v. 69, n. 1, p. 4201-4208, 1991.

MIFSUD, C.; ROWLAND, S. J. Use of salt to control ichthyophthiriosis and prevent saprolegniosis in silver perch, *Bidyanus bidyanus*. **Aquaculture Research**, v. 39, n. 1, p. 1175-1180, 2008.

Ministério da Pesca e Aquicultura. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br>>. Acesso em: 27 set 2011.

MOUSAVI, S.M.; MIRZARGAR, S.S.; MOUSAVI, H.E.Z.; BAIGI, R.O.; KHOSRAVI, A.; BAHONAR, A.; AHMADI, M.R. Evaluation of Antifungal Activity of New Combined Essential Oils in Comparison with Malachite Green of Hatching Rate in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Eggs. **Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v. 4, n. 2, p. 103-110, 2009.

MURTINI, J. T.; PUSPITASARI, Y. P.; SUMARNY, R.. Subchronic Toxicity Effect of Formalin Residue in Fish on the Mouse Liver. **Journal of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology**, v.4, n. 1, p. 81-86, 2009.

MUZZARELLI, R. A. A.; MUZZARELLI, C.; TARSI, R.; MILIANI, M.; GABBANELLI, F.; CARTOLARI, M. Fungistatic Activity of Modified Chitosans against *Saprolegnia parasitica*. **Biomacromolecules**, v.2, n. 1, p. 165-169, 2001.

NOBLE, A. C.; SUMMERFELT, S. T. Diseases Encountered in Rainbow Trout Cultured in Recirculating Systems. **Annual Review of Fish Diseases**, Grã Bretanha, v. 6, n. 1, p. 65-92, 1996.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tombamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas L.*) e pimentão (*Capsicum annanum L.*)**. 1991. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.

PACHECO-MARINO, S. A.; STECIOW, M.M.; BARBEITO, C. First report of Saprolegniosis on eggs and a juvenile of “Argentinian silverside” (*Odontesthes bonariensis*). **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, v. 29, n. 1, p. 10-15, 2009.

PACHECO-MARINO, S.; STECIOW, M.; PAUL, B. Culture media and temperature influence on growth and sexual reproduction of the fish pathogens *Achlya racemosa* and *Saprolegnia ferax*. **Nova Hedwigia**, v. 92, n. 1, p. 273-282, 2011.

PACHECO-MARINO, S.G.; SALIBIAN, A. Acute toxicity of three antifungal chemicals on silverside *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes, 1835) eggs. **International Journal of Environmental and Health**, v. 4, n. 4, p. 333-341, 2010.

PEREIRA, D.I.B.; SANTURIO, J.M.; ALVES, S. H.; ARGENTA, J. S.; PÖTTER, L.; SPANAMBERG, A.; FERREIRO, L. Caspofungin in vitro and in vivo activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 1, p. 1168-1171, 2007.

POTTINGER, T. G.; DAY, J. G. A *Saprolegnia parasitica* challenge system for rainbow trout: assessment of Pyceze as an anti-fungal agent for both fish and ova. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 36, n. 1, p. 129-141, 1999.

RASOWO, J.; OKOTH, O. E.; NGUGI, C. C. Effects of formaldehyde, sodium chloride, potassium permanganate and hydrogen peroxide on hatch rate of African catfish *Clarias gariepinus* eggs. **Aquaculture**, v.269, n. 1, p. 271-277, 2007.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 803 p.

SCHREIER, T. M.; RACH, J. J.; HOWE, G. E. Efficacy of formalin, hydrogen peroxide, and sodium chloride on fungal-infected rainbow trout eggs. **Aquaculture**, v. 140, n. 1, p.323-333, 1996.

SINHA, R.; SRIVASTAVA, S.; ROY, D. Toxicological effects of malachite green. **Aquatic Toxicology**, v. 66, n. 1, p. 319–329, 2004.

SKAAR, I.; STUELAND, S.; HEIER, B. T. A simple in vitro screening method to determine the effects of drugs against growth of *Saprolegnia parasitica*. **Mycological Progress**, v. 4, n. 4, p. 273–279, 2005.

TOLEDO, M. I. et al. **Aplicación del Tomillo (*Thymus vulgaris*) en el manejo de Enfermedades de la Salmonicultura**. Valparaíso, Chile. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, 2007. 63p.

TSUZUKI, M. Y.; AIKAWA, H.; STRÜSSMANN, C. A.; TAKASHIMA, F. Physiological responses to salinity increases in the freshwater silversides *Odontesthes bonariensis* and *O. hatcheri* (Pisces, Atherinidae). **Revista Brasileira de Oceanografia**, v. 48, n. 1, p. 81-85, 2000.

WEST, P. *Saprolegnia parasitica*, an oomycete pathogen with a fishy appetite: new challenges for an old problem. **Mycologist**, v. 20, n. 1, p. 99-104, 2006.

YANONG, P.E. Fungal diseases on fish. **Veterinary clinical of Exotic Animals Practice**, v. 6, n. 1, p.377-400, 2003.

World Health Organization; ICCIDD; UNICEF. **Recommended iodine levels in salt and guidelines for monitoring their adequacy and effectiveness**. Geneva: World Health Organization, 1996. 9p.

ZAKI, M. S.; FAWZI, O.M.; EL-JACKEY, J. Pathological and Biochemical Studies in *Tilapia nilotica* Infected with *Saprolegnia parasitica* and Treated with Potassium Permanganate. **American-Eurasian Journal of Agriculture Enviromental Science**, v. 3, n.5, p. 677-680, 2008.

ZAROR, L.; COLLADO, L.; BOHLE, L.; LANDSKRON, E.; MONTAÑA, J.; AVENDAÑO, F. *Saprolegnia parasitica* en salmones y truchas del sur de Chile. **Archivos de Medicina. Veterinaria**, v. 36, n. 1, 2004.

8. Anexos

Meio de Indução

Em 1000 mL de água destilada estéril: 0,5 mL da solução A [K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $(NH_4)_2HPO_4$ em 500 mL de água destilada estéril] e 0,1mL da solução B [$MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $CaCl_2$ em 250 mL de água destilada estéril].

Índice de Velocidade de Crescimento Micelial

$$\text{Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM)} = \frac{C_1 + C_2 + \dots + C_n}{N_1 + N_2 + \dots + N_n}$$

Onde: C_1, C_2, C_n = crescimento das colônias na primeira, segunda e última avaliação e N_1, N_2, N_n = número de dias.