

Aeromonas caviae DURANTE SURTO DE MORTALIDADE EM TILÁPIA DO NILO E SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA C NA DIETA

Maurício Laterça MARTINS^{1,4*}; Danilo Makoto Yamaguchi MIYAZAKI²;
José Luiz Pedreira MOURIÑO³

RESUMO

Foi avaliada uma alta mortalidade de tilápias-do-Nilo criadas em tanques-rede no reservatório de Três Irmãos, Estado de São Paulo. Num período de 52 dias morreram 1245 peixes, observando-se maiores mortalidades entre 23 e 34 dias após os primeiros sinais clínicos. Os peixes aparentavam estar saudáveis, mas morriam após se alimentarem. Parâmetros aquáticos apresentaram valores normais sem relação com a mortalidade. A necropsia indicou palidez do fígado, e o exame parasitológico revelou baixo número de parasitos protozoários e Monogenoidea na superfície corporal e brânquias. Amostras de fígado e rins foram retiradas para isolamento bacteriano, revelando presença de *Aeromonas caviae*. Após 10 dias de suplementação com 1000 mg de vitamina C/kg de ração, a mortalidade reduziu 58%. A manutenção dos peixes em sistema intensivo, o baixo nível de vitamina C na dieta e o manejo inadequado podem ter colaborado para o surgimento da infecção. Ressalta-se a necessidade da suplementação vitamínica em dietas para tilápias criadas em sistema intensivo.

Palavras-chave: *Oreochromis niloticus*, infecção, *Aeromonas caviae*, mortalidade, vitamina C

Aeromonas caviae DURING MORTALITY ON NILE TILAPIA AND SUPPLEMENTATION WITH VITAMIN C IN THE DIET

ABSTRACT

High mortality in cage-cultured Nile tilapia at Três Irmãos Reservoir, State of São Paulo, was evaluated. In a 52 day period, 1,245 fish died, with higher mortality between 23 and 34 days after the first clinical signs. Fish appeared healthy, but died after fed. Water analysis showed normal values, and was not related to mortality. The liver was pale and parasitological exam showed low number of Protozoa and Monogenoidea on body surface and gills. The isolates from the liver and kidney revealed the presence of *Aeromonas caviae*. After 10 days of supplementation with 1000 mg of vitamin C/kg dry ration, the mortality reduced 58%. The raising of fish in intensive system and the low level of vitamin C in which the fish had been fed, probably increased the susceptibility to bacteria and mortality allied to inadequate handling. It is suggested vitamin supplementation for tilapia reared in intensive systems.

Key words: *Oreochromis niloticus*, infection, *Aeromonas caviae*, mortality, vitamin C

Relato de Caso: Recebido em 08/05/2007 - Aprovado em 23/03/2009

¹ Departamento de Aqüicultura, CCA, UFSC, Rod. SC 404, km 3, 88040-900, Florianópolis, SC

² Poli-nutri Alimentos, Rua Américo Vespúcio, 99/109, 06273-070, Osasco, SP

³ Laboratório de Camarões Marinhos, Departamento de Aqüicultura, CCA, UFSC, Rod. SC 404, km 3, 88040-900, Florianópolis, SC

⁴ Endereço/Address: Departamento de Aqüicultura, CCA, UFSC, Rod. Admar Gonzaga 1346, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.
E-mail: mlaterca@cca.ufsc.br

*Bolsista de Produtividade em Pesquisa/CNPq

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a criação de tilápias em tanques-rede e gaiolas vem apresentando crescente desenvolvimento. Porém, a intensificação nos sistemas de criação vem acompanhada da ocorrência de enfermidades em peixes provocadas por agentes oportunistas (MARTINS *et al.*, 2002).

Dentre as variedades de bactérias do gênero *Aeromonas*, *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria* tem sido caracterizadas como patógenos emergentes podendo causar gastroenterite (AGGER *et al.*, 1985; RALL *et al.*, 1998). Em *Lates calcarifer* mantido em tanque-rede nas Filipinas, TENDÊNCIA (2002) isolou *Vibrio harveyi* sugerindo-o como agente causador de exoftalmia e mortalidades.

Em observação do estado sanitário de peixes na Espanha, TORANZO *et al.* (1993) verificaram até 42% de *Scophthalmus maximus* infectado por *Vibrio* e *Pseudomonas*. VENTURA e GRIZZLE (1987) observaram diferentes portas de entrada de *A. hydrophila* em *Ictalurus punctatus*. Os autores notaram que a elevação na temperatura provocou a instalação da bactéria e o desenvolvimento da doença.

No Estado de São Paulo, 48% das amostras de pintado *Pseudoplatystoma sp.* coletadas de mercados continham *Aeromonas*, sendo que *A. caviae* foi mais freqüente (60%), seguida de *A. hydrophila* (50%) e *A. sobria* (12%), como relatado por RALL *et al.* (1998). Por outro lado, KATOCH *et al.* (2001) verificaram que 66% das amostras de músculo de *Cyprinus carpio*, *Ctenopharyngodon idella*, *Carassius auratus* e *Hypophthalmichthys molitrix* continham *A. caviae*. Observa-se, portanto, que estas bactérias são extremamente oportunistas para peixes de água doce podendo causar severas mortalidades na qualidade de agentes secundários (TORANZO *et al.* 1989; CANDAN *et al.* 1995; OGARA *et al.* 1998; AUSTIN e AUSTIN 1999).

A estabilidade do sistema imunológico para o combate à enfermidades oportunistas pode ser atribuída ao uso da vitamina C nas dietas em níveis adequados, como agente imunomodulador e elemento chave nutricional para pisciculturas em sistemas intensivos melhorando a sobrevivência e combatendo as enfermidades (VERLHAC e GABAUDAN, 1994).

Tendo em vista a importância destes microrganismos e a intensificação da criação de tilápias, muitas vezes caracterizado por manejo inadequado, este estudo objetivou identificar o agente causador

de altas mortalidades em tilápias *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758, mantidas comercialmente em tanques-rede no Estado de São Paulo e avaliou o efeito da suplementação de vitamina C na dieta.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e instalações

Entre 15 de março e 5 de maio de 2000 realizou-se o acompanhamento sanitário de tilápias entre 300 e 600 g de peso, que eram mantidas em 100 tanques-rede de 11 m³ na densidade de 200 peixes/m³, instalados no Reservatório Três Irmãos no Estado de São Paulo.

Durante o período de avaliação, os parâmetros aquáticos mantiveram-se os seguintes: pH 7,58±0,19; condutividade elétrica 154,40±12,29 µS/cm; temperatura 27,28±0,83°C e oxigênio dissolvido 8,02±1,50 mg/L. A mortalidade foi registrada por dia, durante o período anteriormente citado, sendo analisada em três períodos: antes do surto de mortalidade, durante e após o surto.

Análise Parasitológica

Para verificar a eventual presença de parasitos foram feitos esfregaços do corpo, nadadeiras e montagem entre lâmina e lamínula de fragmentos de brânquias e órgãos internos como descrito por GHIRALDELLI *et al.* (2006).

Análise microbiológica

A partir de peixes que apresentavam lesões nas brânquias e nadadeiras, fragmentos de aproximadamente 1 a 2 mm foram coletados em ambiente asséptico para isolamento bacteriano. Após enriquecimento seletivo, em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) por 24 horas a 37°C, as culturas foram semeadas em Agar Sangue. Após a incubação, foram realizados esfregaços pelo método de Gram das colônias características, para identificação morfológica. Em seguida as colônias foram semeadas, com auxílio de alça de níquel-cromo, em Agar Mac Conkey e Agar Vermelho de Fenol Amido Ampicilina (MAJEED *et al.*, 1990; PALUMBO *et al.*, 1985) e em Agar Dextrina-Ampicilina (HAVELAAR e VONK, 1988) para crescimento de bactérias do gênero *Aeromonas*.

Após incubação à 28°C por 24 horas, colônias sugestivas, ou seja, grandes e circundadas por um halo amarelo de hidrólise do amido ou da dextrina, foram semeadas em Agar Tríplice-Açúcar-Ferro (TSI) e submetidas às provas de motilidade, catalase

e oxidase, seguindo esquema adotado por POPOFF (1984), NEVES *et al.* (1990) e HUDSON e LACY (1991) (Tabela 1)

Inclusão de Vitamina C na dieta

A dieta comercial que os animais estavam sendo mantidos apresentava a seguinte composição de rótulo: proteína bruta (28%), extrato etéreo (3%), fibra (7%), cinzas (10%), cálcio (2%), fósforo (0,6%), vitaminas A (8.000 UI), D3 (4.000 UI), E (160 mg), K (4 mg),

B₁ (4 mg), B₂ (14 mg), B₆ (9 mg), B₁₂ (30 mg), niacina (40 mg), ácido fólico (2 mg), ácido pantotênico (40 mg), biotina (0,4%), vitamina C (200 mg), manganês (30 mg), zinco (160 mg), ferro (110 mg), cobre (16 mg), cobalto (0,2 mg), iodo (0,8 mg), selênio (0,6 mg/kg de ração). A ração foi suplementada com 1000 mg de vitamina C/kg de ração, originalmente incluída na formulação pelo fabricante, oferecida diariamente, por dez dias, após a detecção de mortalidade no primeiro período de observação.

Tabela 1. Reação dos testes bioquímicos de acordo com a identificação prevista por POPOFF (1984), NEVES *et al.* (1990) e HUDSON e LACY (1991) para identificação de *Aeromonas caviae*.

Testes bioquímicos	Cepa isolada <i>Aeromonas caviae</i>
Gram	-
Bastonetes soltos e em pares	+
Motilidade	+
Oxidase	+
Lisina	-
Ornitina	-
Arginina	+
Beta-galactosidase	+
Hidrólise de esculina	+
Produção de indol	+
Beta- hemolise	-
Produção de gás pela glicose	-
Arabinose	+
Manitol	+
Manose	+/-
Rafinose	-
Raminose	-
Sorbitol	-
Sacarose	+
Utilização de citrato	+
Voges-Proskauer	-

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A qualidade da água não revelou variação que justificasse alguma relação com a mortalidade. Durante o período observado, os peixes apresentavam comportamento apático, natação errática e morte repentina, principalmente após o oferecimento da ração. Durante o acompanhamento notificou-se a ocorrência de 1.245 animais mortos. A mortalidade no primeiro período foi equivalente a 21 % da mortalidade total, sendo o segundo período caracterizado como surto de mortalidade por ter 68% da mortalidade total. O terceiro período apresentou somente 11% da mortalidade total, indicando o efeito do tratamento e a dissipação do pico de mortalidade.

O exame dos animais revelou erosão das nadadeiras

e extremidade dos filamentos branquiais com áreas de coloração esbranquiçada de aproximadamente 1 a 5 mm. Na cavidade visceral evidenciou-se acúmulo excessivo de tecido gorduroso, sendo que o fígado dos peixes apresentava coloração muito pálida com algumas regiões escuras ou manchas esverdeadas e consistência friável. Frequentemente observaram-se pequenas estruturas circulares brancas na superfície do fígado e dentro do mesmo, as quais foram identificadas como acúmulo de gordura. O exame parasitológico revelou a presença de *Trichodina* sp., *Epistylis* sp. (Protozoa: Ciliophora), *Cichlidogyrus sclerosus* e *Cichlidogyrus* sp. (Monogenoidea: Dactylogyridae) na superfície corporal e brânquias, mas em número que não justificava a mortalidade,

segundo critérios preconizados por TAVARES-DIAS *et al.* (2001).

Não havia sinais externos característicos da doença como os relatados por PLUMB (1994) e REHULKA (2002), porém além dos fígados estarem pálidos, os animais ao serem alimentados morriam.

O exame microscópico dos esfregaços do corpo, nadadeiras e brânquias revelou a presença de grande quantidade de bastonetes bacterianos curtos e móveis. Após o isolamento bacteriano constatou-se a presença de bacilos Gram negativos apresentando as características da família Aeromonadaceae especificamente *Aeromonas caviae* (POPOFF e VERON, 1976) de acordo com os resultados dos testes propostos por POPOFF (1984), e por ABEYTA JUNIOR *et al.* (1990) (Tabela 1).

A partir do fígado e rins, realizou-se cultura para o isolamento bacteriano, constatando-se a presença da enterobactéria. Segundo HOLLIMAN (1993) as *Aeromonas* móveis são onipresentes no ambiente aquático e um habitante normal do intestino de peixes. Portanto, as septicemias causadas por *Aeromonas* são um problema comum em todo o mundo, em todas as espécies de peixes de água doce, de acordo com AOKI (1999) e confirmado nesta avaliação.

Todas as espécies de peixes podem ser susceptíveis a infecções bacterianas, uma vez que estes microorganismos ocorrem naturalmente no ambiente aquático (COSTA, 1998). O fato dos peixes serem mantidos em sistema de criação intensiva com alta densidade, com pouca limpeza das telas dos tanques-rede, aliado ao baixo nível de vitamina C na dieta comercial, provavelmente tiveram sua resistência natural ao patógeno oportunista diminuída (VERLHAC e GABAUDAN, 1994).

Este trabalho permite sugerir também o possível papel da tilápia como portador assintomático de *A. caviae*, assim como o observado por AZAD *et al.* (2001) com *A. hydrophila* em *Oreochromis mossambicus*.

A infecção experimental com *A. sobria* e *A. caviae* em *Oncorhynchus mykiss* provocou o desenvolvimento de lesões na pele, despigmentação, úlceras, exoftalmia, inflamação nas nadadeiras, hiperemia na bexiga natatória e petéquias no fígado (REHULKA, 2002). Por outro lado, em nossa avaliação, não foram observados tais sinais clínicos, que podem variar de acordo com a espécie de peixe afetada e o ambiente em que é mantida. A manutenção de altas densidades de populações de peixes em áreas limitadas favorece a propagação e o surgimento de

doenças responsáveis por grande mortalidade e perdas econômicas significativas. A observação de fígados friáveis nos animais corroborou os achados de PLUMB (1994).

Neste caso, a adição de 1000 mg de vitamina C/kg de ração durante dez dias consecutivos reduziu a mortalidade e a ocorrência de sinais clínicos da doença. A alta quantidade de vitamina C empregada serviu como imunoestimulante naquele momento, resultado também comprovado por ANBARASU e CHANDRAN (2001); LI e LOVELL (1985) e SOLIMAN *et al.* (1994).

Além disso, futuros estudos sobre a virulência de *A. caviae* em peixes de cativeiro devem ser encorajados, tendo em vista seu isolamento durante surtos de mortalidade. A identificação e a correta caracterização dos agentes causadores de enfermidades na piscicultura se fazem necessárias para o reconhecimento de sinais clínicos da doença e de métodos eficazes de controle e profilaxia, evitando assim grandes perdas econômicas e consolidando a atividade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEYTA JÚNIOR, C.; KAYSNER, C.A.; WEKELL, M.M.; STOFF, R.F. 1990 Incidence of motile aeromonads from United States west coast shellfish growing estuaries. *Journal of Food Protection*, Iowa, 53: 849-855.
- AGGER, W.A.; McCORMICK, J.D.; GURWITH, M.J. 1985 Clinical and microbiological features of *Aeromonas hydrophila*-associated diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, 21: 909-913.
- ANBARASU, K e CHANDRAN, M.R. 2001 Effect of ascorbic acid on the immune response of the catfish, *Mystus gulio* (Hamilton), to different bacterins of *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, Aberdeen, 11: 347-355.
- AOKI, T. 1999 Motile aeromonads (*Aeromonas hydrophila*). In: WOO, P.T.K.; BRUNO, D.W. (Ed.) *Fish diseases and disorders*. Oxon: CABI Publ., v.3: Viral, bacterial and fungal infections, cap.11, p.247-453.
- AUSTIN, B. e AUSTIN, D.A. 1999 *Bacterial Fish Pathogens*, 3th edn. Chichester, UK: Springer-Praxis, 364p.
- AZAD, I.S.; RAJENDRAN, K.V.; RAJAN, J.J.S.; VIJAYAN, K.K.; SANTIAGO, T.C. 2001 Virulence

- and histopathology of *Aeromonas hydrophila* (Sah 93) in experimentally infected tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Journal of Aquaculture in the Tropics*, Calcutta, 16(3): 265-275.
- CANDAN, A.; KUCU KER, M.A.; KARATAS, S. 1995 Motile aeromonad septicemia in *Salmo salar* cultured in the black sea in Turkey. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, Parma, 15: 195-196.
- COSTA, A.B. 1998 Ictiopatologia e manejo sanitário em piscicultura intensiva. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, 2., Campinas, 1998. *Anais...* Campinas: CBNA. p.73-96.
- GHIRALDELLI, L.; MARTINS, M.L.; JERÔNIMO, G.T.; YAMASHITA, M.M.; ADAMANTE, W.B. 2006 Ectoparasites communities from *Oreochromis niloticus* cultivated in the State of Santa Catarina, Brazil. *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, USA, 1(2): 181-190.
- HAVELAAR, A.H. e VONK, M. 1988 The preparation of ampicillin dextrin agar for the enumeration of *Aeromonas* in water. *Letters in Applied Microbiology*, Washington, 7: 169-171.
- HOLLIMAN, A. 1993 The veterinary approach to trout. In: BROWN, L. (Ed.). *Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine*. Oxford: Pergamon Press, cap.14., p.223-247.
- HUDSON, J.A. e LACY, K.M. 1991 Incidence of motile aeromonads in New Zealand retail foods. *Journal of Food Protection*, Iowa, 54: 696-699.
- KATOCH, R.C.; SHARMA, M.; VERMA, S.; DHAR, P. 2001 Bacterial pathogens of carps and other fish in Himachal Pradesh. *Indian Veterinary Journal*, Madras, 78: 984-986.
- LI, Y. e LOVELL, R.T. 1985 Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune response in channel catfish. *Journal of Nutrition*, Philadelphia, 115: 123 -131.
- MAJEED, K.N.; EGAN, A.F.; Mac RAE, I.C. 1990 Production of exotoxins by *Aeromonas* spp. at 5°C. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, 69: 332-337.
- MARTINS, M.L.; ONAKA, E.M.; MORAES, F.R.; BOZZO F.R.; PAIVA, A.M.F.C.; GONÇALVES, A. A. 2002 Recent studies on parasitic infections of freshwater cultivated fish in the State of São Paulo, Brazil. *Acta Scientiarum*, Maringá, 24(4): 981-985.
- NEVES, M.S.; NUNES, M.P.; RICCIARDI, I.D. 1990 Incidence of motile *Aeromonas* species in aquatic environments of Rio de Janeiro, Brasil. *Journal of Food Protection*, Iowa, 53: 78-80.
- OGARA, W.O.; MBUTHIA, P.G.; KABURIA, H.F.A.; SØRUM, H.; KAGUNYA, D.K.; NDUTHU, D.I.; COLQUHOUN, D. 1998 Motile aeromonads associated with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) mortality in Kenya. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, Parma, 18: 7-9.
- PALUMBO, S.A.; MAXINO, F.; WILLIAMS, A.C.; BUCHANAN, R.L.; THAÛER, D.W. 1985 Starch-ampicillin agar for the quantitative detection of *Aeromonas hydrophila*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 50: 1027-1030.
- PLUMB, J.A 1994 *Health maintenance of cultured fishes*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 254p.
- POPOFF, M. 1984 Genus III. *Aeromonas* Kluver and Van Niel. p. 545-548. In: N.R. DRIEG (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, WILLIAMS and WILKINS, Baltimore.
- POPOFF, M.; VERON, M. 1976 A taxonomic study of the *Aeromonas hydrophila*-*Aeromonas punctata* group. *Journal of General Microbiology*, New York, 94: 11-22.
- RALL, V.L.M.; IARIA, S.T.; HEIDTMANN, S.; PIMENTA, F.C.; GAMBA, R.C.; PEDROSO, D.M.M. 1998 *Aeromonas* species isolated from pintado fish (*Pseudoplatystoma* sp.): virulence factors and drug susceptibility. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, 29: 222-227.
- REHULKA, J. 2002 *Aeromonas* causes severe skin lesions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): clinical pathology, haematology and biochemistry. *Acta Veterinaria Brno*, Brno, 71: 351-360.
- SOLIMAN, A.K.; JAUNCEY, K.; ROBERTS, R.J. 1994 Water-soluble vitamin requirements of tilapia: ascorbic acid (vitamin C) requirement of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture and Fisheries Management*, Thailand, 25: 269-278.
- TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M.L.; MORAES,

- F.R. 2001 Fauna parasitária de peixes oriundos de “pesque-pague” do município de Franca, São Paulo, Brasil I Protozoários. *Revista Brasileira de Zoologia*, Curitiba, 18: 67-79.
- TENDENCIA, E.A. 2002 *Vibrio harveyi* isolated from cage-cultured seabass *Lates calcarifer* Bloch in the Philippines. *Aquaculture Research*, Oxford, 33: 455-458.
- TORANZO, A.E.; BARJA, A.M.; ROMALDE, J.L.; HETRICK, F.M. 1989 Association of *Aeromonas sobria* with mortalities of adult gizzard shad, *Dorosoma cepedianum* Lesuer. *Journal of Fish Diseases*, Oxford, 12: 439-448.
- TORANZO, A.E.; NOVOA, B.; ROMALDE, J.L.; NUÑEZ, S.; DEVESA, S.; MARIÑO, E.; SILVA, R.; MARTÍNEZ, E.; FIGUERAS, A.; BARJA, J.L. 1993 Microflora associated with healthy and diseased turbot (*Scophthalmus maximus*) from three farms in northwest Spain. *Aquaculture*, Amsterdam, 114: 189-202.
- VENTURA, M.T. e GRIZZLE, J.M. 1987 Evaluation of portals of entry of *Aeromonas hydrophila* in channel catfish. *Aquaculture*, Amsterdam, 65: 205-214.
- VERLHAC, V. e GABAUDAN, J. 1994 Influence of vitamin C on the immune system of salmonids. *Aquaculture and Fisheries Management, Thailand*, 25: 21-36.