

CONTROLE DA AMYLOODINIOSE EM PEIXES-PALHAÇO (*Amphiprion ocellaris*) POR MEIO DE BANHOS TERAPÊUTICOS

Tiago Queiroz de Moraes¹, Octávio Freitas Vieira², Mileni da Silva Pereira Gonçalves¹, Esaú Felipe Vial Laranjeira¹, Henrique David Lavander¹, Leonardo Demier Cardoso¹.

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo – Piúma. Rua Augusto da Costa Oliveira, 660, Praia Doce – 29285-000 – Piúma, Espírito Santo – ES, Brasil, tiagoqueirozdemoraes@gmail.com, milagardioli4@gmail.com, esaularanjeira12@gmail.com, henrique.lavander@ifes.edu.br, leonardodemier@hotmail.com

²Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário. Rua José Lourenço Kelmer, s/n – 36036-900 – São Pedro, Juiz de Fora – MG, Brasil. Octaviofv97@gmail.com

Resumo

O peixe-palhaço (*Amphiprion ocellaris*) é uma espécie ornamental marinha cultivada em sistemas de recirculação (RAS), onde condições controladas favorecem o crescimento e a reprodução. A principal doença observada é a amilodiniose, causada pelo protozoário ectoparasita *Amyloodinium ocellatum*, que se reproduz rapidamente em alta densidade, apresentando três estágios: trofote, tomonte e dinosporo. Peixes infectados exibem coloração opaca, movimentos erráticos, fraqueza e pontos marrons no tegumento, brânquias e nadadeiras. O estudo avaliou banhos terapêuticos com formalina e verde malaquita em diferentes tempos de exposição (1, 2 e 3 horas). O tratamento de 3 horas (T3) foi mais eficiente na remoção dos trofotes, embora tenha causado desgaste nas nadadeiras e aumento da produção de muco. Observou-se que tratamentos curtos (T1 e T2) apresentaram eficácia parcial. Resultados indicam que a combinação de formalina e verde malaquita, na dose de 125 µL/L, é eficaz no controle da amilodiniose em peixes-palhaço. Estes achados contribuem para melhorar a sanidade em aquicultura ornamental marinha e reduzir perdas econômicas.

Palavras-chave: Oodinium. Formalina. Verde malaquita. Tratamento. Peixe marinho.

Área do Conhecimento: Ciências agrárias – Engenharia de Pesca.

Introdução

O peixe palhaço (*Amphiprion ocellaris*), também conhecido por “Nemo”, Anemonefish ou Clownfish, é uma espécie encontrada no oceano Indo – Pacífico Ocidental, em profundidades rasas (Faustin & Allen, 1997). Uma das características mais marcantes é que eles são hermafroditas sequenciais protândricos, sendo que os aspectos como sexo, tamanho e taxa de crescimento são determinados pela posição social que ocupam na hierarquia do grupo (Buston, 2003). Sendo esta, uma característica fundamental para o sucesso do cultivo. A transição de um macho para uma fêmea funcional pode levar de poucos meses até alguns anos (Hoff, 1996).

Dentre os diversos sistemas utilizados na aquicultura, o Sistema de Recirculação (RAS) é bastante apropriado para o cultivo de espécies ornamentais marinhas, proporcionando um maior controle dos parâmetros de qualidade de água, garantindo maior segurança sanitária e permitindo a instalação de sistemas próximo a centros comerciais (Halachmi, 2006).

Em sistema de recirculação, os peixes palhaço podem desovar a cada 15 dias, com desenvolvimento embrionário ocorrendo em cerca de 168 horas, sendo o rotífero *Brachionus sp.* utilizado na primeira alimentação (Avella et al., 2007).

Embora a aquicultura ofereça inúmeros benefícios, também enfrenta desafios consideráveis, destacando-se as doenças que acometem os organismos aquáticos, poluição e deterioração da qualidade de água. A disseminação de doenças não apenas gera perdas econômicas, mas também compromete a eficiência do setor (Barbieri et al., 2014).

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

As doenças são o maior desafio nas unidades de cultivo de peixes ornamentais marinhos, causando alta mortalidade (Dhayanithi et al., 2015). O protozoário *Amyloodinium ocellatum* é um dos ectoparasitas mais importantes, capaz de causar perdas econômicas significativas em sistemas de aquicultura marinha e estuarina, espalhando-se no cultivo em poucos dias (Masson et al., 2011).

O *Amyloodinium ocellatum* possui um ciclo de vida simples, necessitando apenas de um peixe como hospedeiro, reproduzindo-se rapidamente quando os peixes estão em alta densidade. O ciclo de vida é dividido em três fases, sendo trofante, onde está infectando o peixe; tomonete, se desprende do peixe e se divide formando os dinosporos; dinosporos, estágio de natação livre à procura de um novo hospedeiro (Francis-Floyd & Floyd, 2011). Podendo completar o ciclo de vida entre 3 a 6 dias, dependendo dos parâmetros físico-químicos da água (Paperna, 1984).

Dentre os diversos tratamentos para esta infecção, os mais utilizados são a formalina, sulfato de cobre, hidroxiquinona e verde malaquita, sendo aplicados na forma de banhos terapêuticos. (Francis-Floyd & Floyd, 2011; Dhayanithi et al., 2022; Paperna, 1984).

Dado o exposto, este trabalho tem como objetivo avaliar a eficiência no tratamento da doença do veludo, causada pelo protozoário ciliado *A. ocellatum*, utilizando banhos terapêuticos com verde malaquita e formol em diferentes períodos de tempo.

Metodologia

Os peixes utilizados no estudo foram obtidos no Laboratório de Maricultura - LABMAR, no setor de aquicultura do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo – Campus Piúma, mediante aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais, sob o protocolo nº 23185.000564/2023-21.

Os espécimes de *A. ocellaris* eram mantidos em sistema de recirculação aquícola (RAS), possuindo sistema de filtragem em etapas, com filtro mecânico, filtro biológico, filtro ultravioleta e skimmer. Neste sistema, eram mantidos juvenis de peixe palhaço, divididos em oito aquários com volume total de 30 litros. Os peixes mantidos neste sistema, tinham cerca de 60 dias de vida e tamanho médio de 7 ± 2 mm. Os animais eram alimentados quatro vezes ao dia, até a saciedade aparente com ração comercial, contendo 48% de proteína bruta, 12% de umidade, 5% de extrato etéreo e 12% de matéria mineral.

Semanalmente, eram aferidos os parâmetros físico-químicos de qualidade de água, tais como oxigênio dissolvido e temperatura (EcoSense DO200A), salinidade (Kasvi K52-100), amônia, nitrito, pH e alcalinidade (HANNA Instruments HI83303), além de trocas parciais mensais de água, de 15% do volume do sistema.

Diariamente, os peixes eram observados, e ao apresentarem quadro característico de epizootia parasitária, como realizada por Widiartini et al. (2022), foram submetidos à exames parasitológicos para fins diagnósticos. Foram coletados 5% dos animais com sinais evidentes da doença para a observação do tegumento e brânquias, utilizando microscópio óptico, com aumentos de 40x e 100x. Toda amostra coletada foi armazenada em solução de formalina 4%.

As concentrações utilizadas foram baseadas na literatura, onde foi formulado um produto contendo Formalina, verde malaquita e azul de metileno, na proporção de 250:1:1. Foram realizados 3 tratamentos diferentes, realizados em três aquários, cada um com 5 litros de água, contendo 125 µL/L da solução. Em cada unidade experimental, foram adicionados nove peixes infectados pelo protozoário *A. ocellatum*. Os peixes foram submetidos à banhos terapêuticos, por uma hora (T1), duas horas (T2) e três horas (T3). Após o tempo determinado, todos os peixes foram removidos da solução e acondicionados em aquários com água marinha esterilizada para análise individual em estereomicroscópio.

Resultados

A qualidade de água do sistema dos animais aferidos, possuíam as seguintes médias: oxigênio dissolvido, $5,41 \pm 0,54$ mg/L; salinidade, $35,6 \pm 0,51$; pH, $7,48 \pm 0,34$; Temperatura, $27,36 \pm 1,28$ °C; amônia, $0,51 \pm 0,43$ mg/L; Nitrito, $0,23 \pm 0,22$ mg/L e alcalinidade, $2,72 \pm 0,46$ dkh.

Os peixes infectados apresentaram características comportamentais anormais, tais como movimento opercular acelerado, natação errática na superfície do tanque, esfregando-se contra as paredes do aquário, em objetos ou substratos e apresentou redução do apetite. Além do

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

comportamento anormal, os peixes demonstraram coloração opaca, perda de massa muscular dorsal e porção ventral retraída (figura 1A). Ao longo de todo tegumento, foi constatada a presença de diversos pontos de coloração marrom, com aparência semelhante ao veludo (figura 1B). Com o agravamento do quadro clínico, os peixes apresentaram fraqueza, dificuldades para realizar a natação, permanecendo no fundo do tanque, seguido de morte.

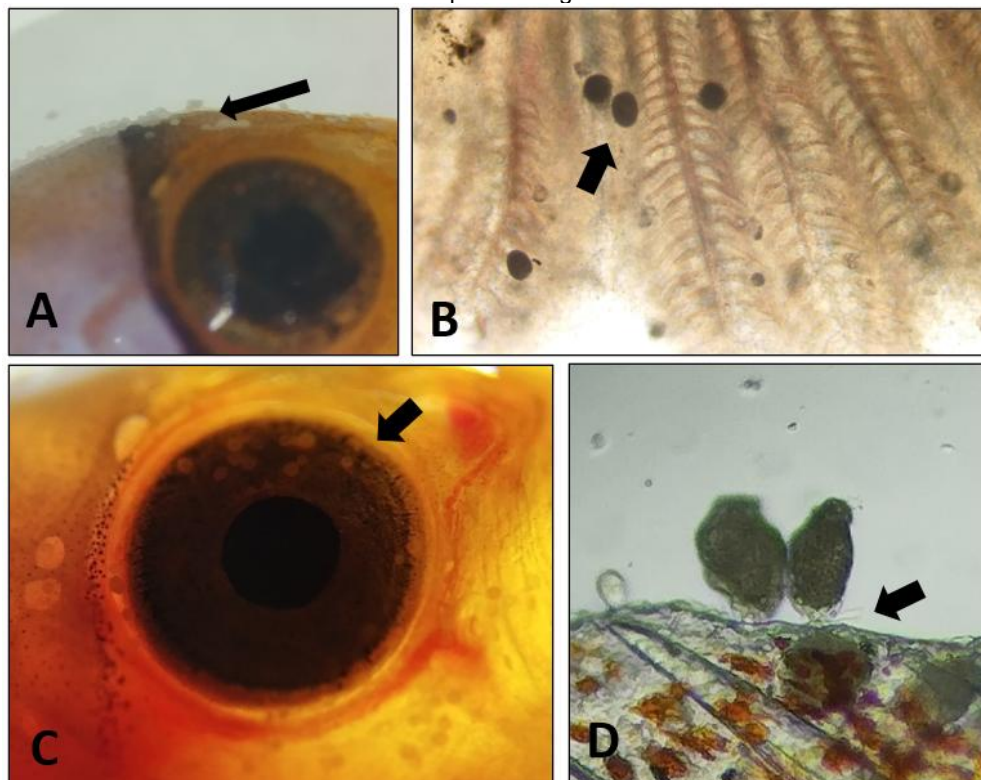
Figura 1 – A. Peixe palhaço com porção ventral retraída; B. Pontos de coloração marrom



Fonte: Os autores

No exame parasitológico, foi observado em 100% dos animais analisados, pontos enegrecidos ao longo de toda superfície tegumentar (figura 2A), nadadeiras, brânquias (figura 2B) e córnea (figura 2C), evidenciando a presença de ectoparasitos dinoflagelados, identificados como *A. ocellatum*, na fase trofante. Estes trofontes, possuem formato oval, de coloração escura e sem movimentação, sendo fixadas no tegumento a partir de flagelos (figura 2D).

Figura 2 – A. Protozoários no tegumento; B. Trofontes nas lamelas branquiais; C. Trofontes na córnea; D. Destaque nos flagelos.

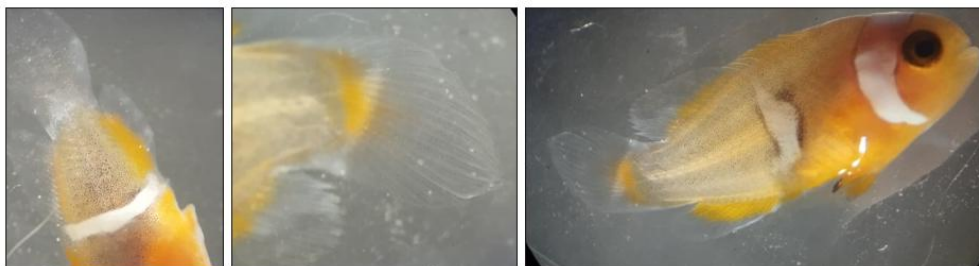


Fonte: Os autores

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

O tratamento 1 (T1) não apresentou eficiência na remoção dos trofontes de *A. ocellatum*, sendo possível observar diversos pontos distribuídos em toda superfície tegumentar do animal, como mostra na figura 3.

Figura 3 – Pontos de Oodiniose na superfície corporal



Fonte: Os autores

O tratamento 2 (T2) apresentou uma ligeira eficiência na remoção dos trofontes de *A. ocellatum*, sendo possível identificar poucos pontos no tegumento dos peixes, evidenciando uma melhora no quadro clínico. A ausência de protozoários foi identificada em cerca de 45% dos peixes. Também foi possível observar um desgaste na região periférica das nadadeiras.

Figura 4 – Protozoários no tegumento e destaque nas nadadeiras



Fonte: Os autores

No tratamento 3 (T3) não foi possível encontrar protozoários na superfície tegumentar dos peixes, o que demonstra que o tratamento foi eficiente no tempo de 3 horas de imersão nesta solução. Contudo, foi possível observar lesões nas nadadeiras, semelhantes a desgaste ou até mesmo desfiamento, além da excreção considerável de muco. Os peixes apresentaram comportamento de natação rápida e sinais de estresse, podendo estar relacionado à possível intoxicação devido ao tempo de exposição aos medicamentos.

Figura 5 – Destaque na ausência de protozoários e desgaste nas nadadeiras com liberação de muco



Fonte: Os autores

Discussão

Diversos estudos foram realizados utilizando medicamentos e outros produtos químicos para o tratamento de oodiniase em peixes palhaço, como feito por Dhayanithi et al. (2022), onde foram utilizadas diversas formas de tratamento, dentre eles o verde malaquita e a formalina, nas concentrações de 10ppm por 14 dias em imersão, resultando em uma sobrevivência média de 41% e 32%, respectivamente.

Um estudo realizado por Paperna (1984), foi possível observar que a esporulação de *A. ocellatum* foi suprimida mesmo utilizando baixas concentrações de verde malaquita, quanto a 0,5ppm, em testes realizados in vitro.

Segundo Francis-Floyd & Floyd (2011), concentrações baixas de formalina, como 25mg/L⁻¹ são suficientes para desprender os trofontes de *A. ocellatum* do tegumento de peixes em poucas horas de imersão, como pode ser observado neste estudo.

O uso de formalina é comum para tratamento contra protozoários e trematódeos monogenéticos, além de ser considerado altamente eficaz contra o protozoário ciliado *Ichthyophthirius multifiliis*, causador da doença conhecida como Ictio, quando usado de forma combinada com o verde malaquita (Goven; Dawe; Gratzek, 1981). Este tratamento pode ser eficiente contra o oodinium, pois possuem semelhança no ciclo de vida e na forma em que infectam os organismos (Bower; Turner; Biever, 1987).

Foram observadas altas taxas de mortalidade em Guppys (*Poecilia reticulata*) expostos ao verde malaquita, mesmo em baixas concentrações, ocorrendo a mortalidade de 31% em 24 horas e 50% em 96 horas, nas concentrações de 0,6 mg/L⁻¹ (Dávila, 2015). Isto indica que a exposição pode causar efeitos tóxicos, como a degradação das nadadeiras, evidenciando a necessidade de cautela no uso deste agente terapêutico.

Conclusão

Banhos de imersão utilizando a formalina combinada com o verde malaquita mostrou-se eficiente para o tratamento de peixes palhaço acometidos por *A. ocellatum*, desde que seja utilizada a dose de 125ul/L, por um tempo máximo de três horas.

Referências

AVELLA, M. A. et al. The role of fatty acids enrichments in the larviculture of false percula clownfish *Amphiprion ocellaris*. **Aquaculture**, v. 273, n. 1, p. 87-95, 2007.

BARBIERI, Edison et al. Avaliação dos Impactos ambientais e socioeconômicos da aquicultura na região estuarina-lagunar de Cananéia, São Paulo, Brasil. **Revista de Gestão Costeira Integrada-Journal of Integrated Coastal Zone Management**, v. 14, n. 3, p. 385-398, 2014.

BOWER, Carol E.; TURNER, David T.; BIEVER, Ronald C. Um método padronizado de propagação do parasita de peixes marinhos, *Amyloodinium ocellatum*. **The Journal of Parasitology**, p. 85-88, 1987.

BUSTON, P. Modificação de tamanho e crescimento em peixes-palhaço: a mudança de sexo não é a única maneira pela qual esses peixes alcançam a dominância — eles crescem e assumem o papel. **Nature (Londres)**, v. 424, p. 145-146, 2003.

DÁVILA, Elenize Mombaque. Doses letais de verde malaquita utilizado em (*Poecilia reticulata*). 21 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Aquicultura) - Universidade Federal do Pampa, Uruguai, 2015.

DHAYANITHI, Nagarajan Balachandran et al. Immune protection by *Rhizophora apiculata* in clownfish against *Vibrio alginolyticus*. **Aquaculture**, v. 446, p. 1-6, 2015.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

DHAYANITHI, Nagarajan Balachandran et al. Study on amyloodiniosis outbreak in captive-bred percula clownfish (*Amphiprion percula*) and improved control regimens. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 46, n. 4, p. 1103-1109, 2022.

FAUTIN, D.G, ALLEN, G.R. Anemonefishes and their host sea anemones: a guide for aquarists and divers. Perth: Western Australian Museum; 1997.

FRANCIS-FLOYD, Ruth; FLOYD, Maxine R. Amyloodinium ocellatum, an important parasite of cultured marine fish. 2011.

GOVEN, Beverly A.; DAWE, Donald L.; GRATZEK, John B. In vitro demonstration of serological cross-reactivity between *Ichthyophthirius multifiliis* foquet and *Tetrahymena pyriformis* Iwoff. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 5, n. 2, p. 283-289, 1981.

HALACHMI, Ilan. Systems engineering for ornamental fish production in a recirculating aquaculture system. **Aquaculture**, v. 259, n. 1-4, p. 300-314, 2006.

HOFF, F. H. Conditioning, spawning and rearing of fish with emphasis on marine clownfish. Aquaculture Consultants. **Inc., Dade City, Florida, USA**, 1996.

MASSON, Ignacio; BLAYLOCK, Reginald B.; LOTZ, Jeffrey M. Susceptibility and tolerance of spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus*, and red snapper, *Lutjanus campechanus*, to experimental infections with *Amyloodinium ocellatum*. **Journal of Parasitology**, v. 97, n. 4, p. 577-585, 2011.

PAPERNA, Ilan. Chemical control of *Amyloodinium ocellatum* (Brown 1931)(Dinoflagellida) infections: in vitro tests and treatment trials with infected fishes. **Aquaculture**, v. 38, n. 1, p. 1-18, 1984.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Instituto Federal do Espírito Santo – *Campus Piúma* pela disponibilização de estruturas laboratoriais para a execução deste estudo.