Efeito do Permanganato de Potássio no Crescimento Micelial de *Aphanomyces* sp. oriundo de ovos de *Danio rerio**

Karen de Souza Ferreira, Débora Rodrigues da Silva Colombo, Leonardo Tachibana, Cláudia Maris Ferreira e Cíntia Badaró-Pedroso

Instituto de Pesca, APTA, SAA-SP

Email: karen_kdma@hotmail.com
*Apoio financeiro: CAPES

Resumo: Doenças fúngicas em peixes e seus ovos ocorrem frequentemente em sistema intensivo. Atualmente são utilizados para o tratamento produtos químicos não permitidos para aquicultura. O objetivo foi avaliar o efeito fungicida do permanganato de potássio no crescimento e desenvolvimento das hifas de *Aphanomyces* sp. em meio de cultura. O isolamento se deu de amostras de ovos de *Danio rerio*. Após isolamento, foi adicionado permanganato de potássio ao meio de cultura YPSS/4 e, vertido em placas, após o resfriamento, foi inserido um inóculo de 6mm com micélio. As placas foram mantidas na estufa biológica a 22ºC por 96 horas e o crescimento foi avaliado a cada 24 horas em centímetros. A CE50 foi calculada pelo programa Spearman Karber para o ensaio definitivo de 164,62 $mg.L^{-1}$ e CMI de 337,5 $mg.L^{-1}$.

Palavras–Chave: Permanganato de potássio, *Aphanomyces* sp., *Danio rerio*, Ensaio *in vitro*, Patologia

Effect of potassium permanganate in mycelial growth of *Aphanomyces* sp. originating from eggs of *Danio rerio*

Abstract: Fungal diseases in fish and their eggs occur frequently in an intensive system. Chemicals not allowed for aquaculture are currently used for the treatment. The objective was to evaluate the fungicidal effect of potassium permanganate on the growth and development of the hyphae of *Aphanomyces* sp. in culture medium. Isolation was from samples of *Danio rerio* eggs. After isolation, potassium permanganate was added to the YPSS/4 culture medium and, after plating, a 6mm inoculum with mycelium was inserted after cooling. Plates were maintained in the biological oven at 22°C for 96 hours and growth was evaluated every 24 hours in centimeters. EC 50 was calculated by the Spearman Karber program for the final assay of 164.62 $mg.L^{-1}$ and MIC of 337.5 $mg.L^{-1}$.

Keywords: Potassium permanganate, *Aphanomyces* sp., *Danio rerio*, *In vitro* assay, Pathology

Introdução

O cultivo de peixes em sistema de produção intensivo depende de diversos fatores ambientais e de práticas de manejo adequado, como a qualidade da água, temperatura compatível ao ideal da espécie, ração balanceada e a limpeza correta dos recintos de criação, dado que a intensificação da produção pode favorecer o surgimento de doenças oportunistas

[1]. As micoses dérmicas são doenças oportunistas, ocasionadas principalmente por oomicetos. A chegada do inverno propicia a infecção por fungos em peixes, vários métodos são utilizados para evitar ou, até mesmo, tratar os organismos, sendo que vários destes produtos são altamente tóxicos se administrados de maneira incorreta [2].

A carência de fármacos para o uso na aquicultura no Brasil faz com que produtores utilizem produtos não regulamentados para a atividade [3] sem que ainda se saiba os problemas que uso incorreto destes produtos causa aos ambientes aquáticos [4].

Objetivos

A partir desta problemática, este trabalho tem por objetivo avaliar o efeito fungicida do permanganato de potássio no crescimento e desenvolvimento das hifas de *Aphanomyces* sp. em meio de cultura.

Materiais e Métodos

Isolamento, identificação e manutenção

A cepa utilizada foi isolada de ovos coagulados de *Danio rerio* oriundos do laboratório de Criação de *D. rerio* do Centro de Aquicultura do Instituto de Pesca. O micélio presente nos ovos foi transferido para placas de Petri [5], mantidas a 22°C por cinco dias, sem luminosidade, contendo ágar-levedura acrescido dos antibióticos sulfato de estreptomicina, penicilina G e vancomicina nas concentrações de 0,1g, 0,2g e 0,02g.L^{-1}, respectivamente [6], visando a purificação do isolado.

Após a purificação, as colônias foram encaminhadas para identificação morfológica no Instituto Botânico IBot-SMA/SP no Laboratório de Micologia por taxonomia clássica, embasada na chave taxonômica [7] e posteriormente por biologia molecular PCR até gênero no laboratório de sequenciamento de DNA do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Após o crescimento e purificação, foram feitas réplicas do patógeno em placa de Petri contendo meio de cultura Yeast-Starch (YpSs) [8] com adaptações: para cada litro de água destilada foi adicionado 5g de amido solúvel, 0,25g de extrato de levedura, 0,25g de fosfato de potássio, 0,125g de sulfato de magnésio, 15g de ágar e autoclavado a 121°C por 30 minutos, com este meio, o oomiceto apresentou melhor crescimento micelial.

Testes in vitro

Preliminarmente foi realizado um ensaio, para determinar a faixa inibitória para o oomiceto *Aphanomyces*, as concentrações utilizadas foram 0,01; 0,1; 1; 10; 100; 1.000; e 10.000 mg/L de permanganato de potássio ($KMnO_4$) da CAAL®, e definidamente com as concentrações de 100; 150; 225; 337,5; 506,25; 759,38 e 1139,07 $mg.L^{-1}$, o ensaio de inibição de 100% do crescimento do patógeno, as concentrações utilizadas foram 225; 240; 255; 270; 285; 300; 315 e 337,5 $mg.L^{-1}$ para $KMnO_4$.

O $KMnO_4$ foi adicionado e homogenizado no meio YPSS morno e em estado líquido e, vertido em placa de Petri [5]. Após solidificação foi adicionado um inóculo o oomiceto de 6mm no centro da placa e foi observado seu desenvolvimento por 96 horas em estufa biológica a 22°C. Os inóculos de micélio utilizados nos testes era de no máximo de 7 dias e retirados da periferia da placa.

Cada placa corresponde a uma repetição e, para cada tratamento, três placas foram preparadas. Além das concentrações da substância alvo, os ensaios apresentaram um grupo controle contendo apenas o meio de cultura e o inoculo como controle positivo e, um grupo controle negativo somente com YPSS. O efeito da substância sobre o crescimento foi avaliado através da medida diária do crescimento radial das colônias, o qual foi avaliado em dois eixos em centímetros.

Análise estatística

Ao final de 96 horas foi estimada a CE50;96h utilizando o software Trimmed Spearman Karber em ambos testes. Os resultados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, sob nível de significância de 5%.

Resultados

O patógeno isolado foi do gênero *Aphanomyces* sp. Todos os repiques para a manutenção do oomiceto, inclusive os controles positivos dos ensaios apresentaram crescimento total ou superior a 95% (8,1 cm) da placa em 96 horas.

Os repiques utilizados durante os ensaios, foram igualmente testados com a substância de referência sulfato de cobre ($CuSO_4$), tendo demonstrado níveis de sensibilidade dentro dos padrões aceitáveis, com variações menores de 30% entre ensaios [9].

O $KMnO_4$ apresentou CE50;96h no ensaio definitivo de 164,62 $mg.L^{-1}$, com intervalo de confiança de 158,33 a 171,16 e CMI100 de 337,5 $mg.L^{-1}$.

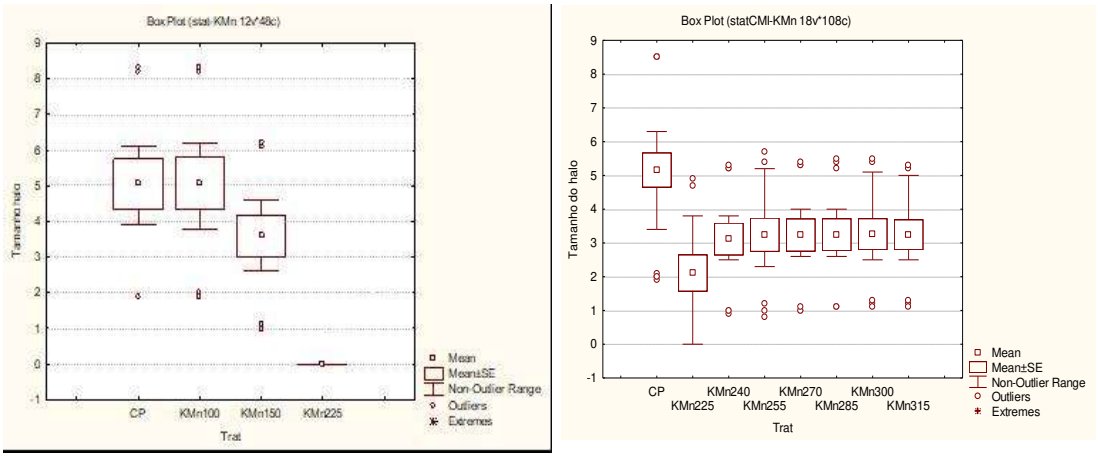

Figura 1: Box plots dos ensaios definitivo e de concentração mínina inibitória do permanganato de potássio fronte ao crescimento micelial do oomiceto *Aphanomyces* sp. oriundo de ovos de *Danio rerio* em meio de cultura. Ensaio definitivo: Teste H = 2,254580 p=0,0263 Ensaio CMI**:** Teste H = 15,87020 p=0,3239

Discussão

O permanganato de potássio ($KMnO_4$) é amplamente empregado na piscicultura para o controle de parasitos como o *Ichthyophthirius multifiliis* e, também é empregado no tratamento de fungos e outros ectoparisitos [10].

Em ensaios *in vitro* com *Aphanomyces invadans* [11] obteve um CMI para o $KMnO_4$ de 250 $mg.L^{-1}$, resultado pouco superior ao encontrado neste trabalho, de 225 $mg.L^{-1}$. Enquanto [5] com *Saprolegnia* sp. apresentou redução da velocidade de crescimento a partir de 100 $mg.L^{-1}$, enquanto com *Aphanomyces* o resultado se deu com a concentração de 150 $mg.L^{-1}$, porém o autor ainda apresentou crescimento em 5000 $mg.L^{-1}$. Porém, [12] observou que concentrações de 100 e 150 $mg.L^{-1}$ de $KMnO_4$ controlaram o crescimento dos fungos, mas foram tóxicos para os ovos de *Pacifastacus leniusculus*, assim inviabilizando a sua utilização para tratamento de ovos.

Com relação ao ensaio definitivo, a concentração de 225 $mg.L^{-1}$ inibiu totalmente o crescimento, porém foi observado que o organismo teve outro comportamento em concentrações mais altas, o seu crescimento foi acelerado e ficou comprovado no ensaio CMI, poderia ser associado ao efeito *hormesis*, onde a substância promove crescimento ao entrar em contato com uma substância tóxica. Segundo [13] a relação concentração-efeito está diretamente atrelada aos receptores ou capacidade do organismo de metabolizar uma

determinada substância, porém, existe um linear para essa capacidade, devido aos mecanismos entre o xenobiótico e o organismo. Dessa forma, acredita-se que o emprego do permanganato de potássio no controle da enfermidade em peixes torna-se inviável, uma vez que as concentrações necessárias para a inibição do crescimento do oomiceto encontram-se bem acima dos níveis de tolerância [14-5].

Conclusão

O permanganato de potássio tem efeito fungicida em *Aphanomyces* sp. em meio de cultura em concentrações acima de 337,5 $mg.L^{-1}$, com uma concentração efetiva de 50% de inibição de CE50;96h no ensaio definitivo de 164,62 $mg.L^{-1}$.

Referências

1. Hipolito, M (2009). Fungos em peixes e anfíbios: diagnóstico, prevenção e tratamento. Instituto Biológico (IB). Disponível em (http://www.biologico.agricultura.sp.gov.br/ artigos_ok.php?id_artigo=98). Visualizado em 11/05/2017.
2. Andrade, RLB de, Andrade LS de; Boscolo WR; Soares CM (2005). Comportamento, sobrevivência e desenvolvimento de lebistes, *Poecilia reticulata,* submetidos a agentes utilizados na profilaxia de doenças. Acta Sci. Anim. Sci. Maringá, v. 27, n. 4, p. 523-528, Oct./Dec.
3. Campos, J. L. (2005). A falta de produtos registrados para uso em aquicultura no Brasil. Uma brecha para a imposição de barreira comercial e riscos para os consumidores. Panorama da aquicultura. 15. 87. p. 14-15.
4. Florêncio T, Carraschi SP, Cruz C, Silva AF, Marques AM, Pitelli RA (2014). Bioindicadores neotropicais de ecotoxicidade e risco ambiental de fármacos de interesse para aquicultura. Bol. Inst. Pesca, v. 40, n. 4, p. 569-576.
5. Corrêa, B. F., Stohl, F. E., Robaldo, R. B., Pereira, D. I. B. 2013 Efeito in vitro de químicos no crescimento micelial de *Saprolegnia* spp. no crescimento micelial de *Saprolegnia* spp. Nota. Ciência Rural, Santa Maria, v.43, n.6, p.1021-1024, jun, 2013
6. Nascimento, C. de A.; Pires-Zottarelli, C. L. A. 2012 Diversidade de fungos zoospóricos da Reserva Biológica de Mogi Guaçu, estado de São Paulo, Brasil. Rodriguésia, Rio de Janeiro, v. 63, n. 3, p. 587-611, Set 2012.
7. Johnson, T. W.; Seymour, R. L.; Padget, D. E. Biology and systematic of the Saprolegniaceae. (2002). Disponível em: (http://dl.uncw.edu/digilib/biology/fungi/ taxonomy%20and%20systematics/ padgett%20book/). Visualizado: 12/03/2016
8. Emerson, R. (1941). An experimental study of the life cycles and taxonomy of Allomyces. Lloydia 4: 77-144.
9. Zagatto, P.A. & Bertoletti. E. (2008) Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações. São Carlos. Ed. Rima, 464p.
10. Pavanelli, G. C.; Eiras, J. da C.; Takemoto, R. M. (2008). Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. 3. ed. Maringá: EDUEM, 311 p.
11. Campbell RE, Lilley JH, Panyawachira V, Kanchanakhan S (2001). *In vitro* screening of novel treatments for *Aphanomyces invadans*. Aquacult. Res., 32, 223-233.

12.Melendre, PM, Celada JD, Carral J M, Saez-Royuela M, Aguilera A. (2006). Effectiveness of antifungal treatments during artificial incubation of the signal crayfish eggs (*Pacifastacus leniusculus* Dana. *Astacidae*). Aquaculture, v. 257, p. 257-265.
13. Nikinmaa M (2014) An Introduction to Aquatic Toxicology. Oxford: Elsevier 253p.
14. Swaef, ED, Broeck, WV den, Dierckens K, Decostre A. (2015). Disinfection of teleost eggs: a review. Reviews in Aquaculture (2015) 7, 1–21. – Wiley Publishing Asia.