



Mortalidade em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) ocasionada por *Pantoea agglomerans* e *Pseudomonas aeruginosa* em tanque escavado

Mortality in Pacus (*Piaractus mesopotamicus*) caused by *Pantoea agglomerans* and *Pseudomonas aeruginosa* in Excavated Tank

Milena Wolff Ferreira¹, Ricardo Martins Santos¹, Alanderson Rodrigues da Silva², Elizangela Domenis Marino¹, Sarah Saory Makimoto¹, Guilherme Ribeiro Capibaribe Barbosa¹ & Gisele Brasileiro de Andrade³

ABSTRACT

Background: Fish production in Brazil is growing strongly. This growth is being mainly driven by mainland aquaculture, which in 2017 produced 691.700 tons of fish. To improve production levels, fish farms have become increasingly intensive, but in these systems, the high fish densities in the ponds, the high feeding rate, and the high organic matter levels in the water can lead the fish becoming stressed. This can cause bacterial proliferation and an increase in mortality. Most species of fish-causing bacteria are saprophytes. They are found naturally in the environment and are usually responsible for secondary or opportunistic infections. This study reports on an outbreak of Pacus (*Piaractus mesopotamicus*) mortality at an intensive fish farm, in the municipality of Campo Grande, MS, Brazil, that used excavated tanks.

Cases: The outbreak occurred at a fish farm in the municipality of Campo Grande, MS, during August, 2015. A total of 200 pacus in two tanks died after they showed the following symptoms: lethargy, anorexia, increased mucus production, and disordered swimming and water surface searching. The temperature and dissolved oxygen were measured using a digital thermometer and an oximeter, respectively, and water transparency was measured with a Secchi disc. The pH was measured using a portable digital potentiometer. The values for the water quality parameters analyzed during the mortality period were temperature, 22.5°C; transparency, 20 cm; oxygen dissolved in the early morning 3 mg/L and at the end of the afternoon, 4.5 mg/L; pH 8.3; and toxic ammonia, 0.002 ppm. Five fishes were collected from the tank, immediately cooled to 4°C, and sent to the Microbiology and Pathology Laboratories to perform the microbiological and pathological laboratory procedures. After the replication process, the slow glucose fermentation characteristics in MacConkey Agar and other biochemical tests showed that the lactose non-fermenter bacterium was *Pseudomonas aeruginosa* and the fermenting bacterium was *Pantoea agglomerans*. A necroscopic examination revealed congestion of viscera in general and thickening of the gills; the histopathological examination showed an intense inflammatory reaction in the gills; and the liver showed congestion and dilation of the central, hepatoportal, and sinusoidal veins, marked cytoplasmic vacuolization, the presence of hemosiderin and leukocytosis, and coagulation necrosis and cholestasis foci.

Discussion: The water temperature in the tanks (22.5°C) was lower than what is considered ideal for tropical fish. It ranged from 25 to 32°C. Furthermore, the pH (8.3) was close to the limit of what is considered appropriate. The mean tank flow rate at the time of death was 15 L/min, corresponding to a daily renewal rate of 1.2%, which was lower than the 10% per day recommended as the ideal rate for excavated ponds in a semi-intensive production system. The decreased water flow in the tank during the period when mortality was recorded caused an increase in the amount of accumulated organic matter. This rise is commonly referred to as eutrophication, which is characterized by an increase in the rate of decomposition and release of nutrients into the water. The excess nutrients, mainly nitrogen and phosphorus, cause excessive phytoplankton and aquatic macrophyte growth, which results in a significant reduction in the amount of dissolved oxygen, particularly during periods of low photosynthetic activity. In this case study, the cause of the fish mortality was attributed to opportunistic infection by *Pantoea agglomerans* and *Pseudomonas aeruginosa* caused by imbalances in water quality.

Keywords: pathology, microbiology, fish farming.

Descritores: patologia, microbiologia, piscicultura.

DOI: 10.22456/1679-9216.90826

Received: 22 November 2018

Accepted: 8 March 2019

Published: 26 March 2019

¹Universidade Católica Dom Bosco (UCDB); ²Programa de Pós-graduação em Biotecnologia & ³Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária, UCDB, Campo Grande, MS, Brazil. CORRESPONDENCE: A.R. Silva [alander_rodrigues@hotmail.com - Tel.: +55 (67) 3312-3797]. Setor de Patologia Veterinária, Hospital Veterinário (Hovet) -UCDB. Av. Tamarandá n.6000. CEP 79117-900 Campo Grande, MS, Brazil.

INTRODUÇÃO

A atividade de pescados no Brasil encontra-se em pleno crescimento, sendo impulsionada principalmente pela aquicultura continental, com uma produção de 691.700 toneladas em 2017 [12]. Para o aumento da produção, as pisciculturas têm se tornado cada vez mais intensivas. Entretanto, nos sistemas de cultivo intensivo, a alta densidade de peixes, a alta taxa de arraçoamento, e a grande quantidade de matéria orgânica na água são fatores potencialmente causadores de estresse e que favorecem a proliferação de bactérias com consequente mortalidade [22].

A mortandade de peixes pode ser atribuída a três fatores que interagem: substâncias tóxicas, fatores ambientais e patógenos [8]. A maioria das espécies de bactérias causadoras de enfermidades em peixes são sapróbicas, encontradas naturalmente no meio ambiente sendo normalmente responsáveis por infecções secundárias ou oportunistas [5,16].

A *Pantoea agglomerans* é uma bactéria pertencente a família Enterobacteriaceae, gram negativa, que pode ser encontrada no solo e na água [13,19]. Pode ser patogênica para plantas, animais vertebrados e invertebrados, inclusive seres humanos imunossuprimidos [18]. *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria gram-negativa de alta adaptabilidade que pode ser encontrada em solo, água, plantas, ambientes marinhos e tecidos de animais [11], fazendo parte da microbiota normal de peixes [2].

Assim, objetivou-se relatar um surto de mortandade de Pacus (*Piaractus mesopotamicus*) criados em sistema semi-intensivo em tanques escavados no município de Campo Grande, MS.

CASO

O surto ocorreu em uma piscicultura do município de Campo Grande, MS. Um total de 200 pacus, acondicionados em dois tanques, vieram a óbito com sintomatologia de letargia, anorexia, aumento da produção de muco, nado desordenado e busca da superfície da água.

Os peixes eram criados em tanque escavado, em sistema aberto, com uma taxa média de renovação de água de 1,2% ao dia, evidenciada durante o período da mortalidade. A criação adotava o sistema intensivo de monocultivo, com densidade de aproximadamente 2,0 kg de peixe/m². Os peixes eram alimentados com ração comercial, contendo 36% de proteína e 3.000

Kcal/kg, divididas em três ofertas diárias, correspondendo, no conjunto, a 4% da biomassa total presente no tanque.

O acompanhamento das condições de qualidade da água foi realizado a cada dois dias, no período em que se observou a mortalidade, identificando-se, no período, uma considerável redução do fluxo de água. A temperatura e o oxigênio dissolvido foram aferidos, respectivamente, com termômetro e oxímetro digitais, a transparência foi medida com disco de Secchi, o pH foi avaliado por meio de um potenciômetro digital portátil (Digmed®)¹ e a amônia tóxica avaliada por kit comercial (Alcon®)².

Os cinco peixes amostrados foram recolhidos do tanque, imediatamente resfriados a 4°C e encaminhados aos setores de Microbiologia e de Patologia da Universidade Católica Dom Bosco, para realização dos procedimentos laboratoriais microbiológicos e patológicos.

As amostras biológicas foram analisadas em uma capela de fluxo laminar contínuo. Com o auxílio de um bisturi e de um *swab* estéril foram coletadas amostras biológicas das brânquias, escamas, cavidade abdominal e tecido muscular.

Todas as amostras coletadas foram armazenadas em um recipiente contendo água peptonada 0,1% por 24 h. Após este período, foi realizado um *pool* de amostras de cada peixe e semeadura em 10 µL (alça calibrada descartável) de cada *pool* em duplicata, nos seguintes meios: Agar Manitol, Agar Sabouraud, Agar MacConkey e Agar Sangue. Para a identificação das colônias isoladas nos meios, foram utilizados os seguintes testes bioquímicos: TSI, SIM, Citrato e Teste da Catalase.

No setor de patologia, foi realizada a necropsia de 5 animais e fragmentos de tecidos foram coletados, fixados em formol a 10% e encaminhados para a análise histopatológica. Após a fixação, os fragmentos de tecidos foram desidratados em soluções alcoólicas crescentes (álcool 70%, 80%, 90% e 100% I e II), permanecendo durante 1h em cada solução. Posteriormente os fragmentos foram diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Os cortes histológicos dos blocos de parafina foram realizados em micrótomo de rotação a 4 µm de espessura, e corados segundo a técnica da Hematoxilina-Eosina (H&E).

Entre os valores médios dos parâmetros de qualidade de água analisados durante o período de

mortalidade, foi observado temperatura de 22,5°C, pH 8,3, transparência em 20 cm e concentração de amônia tóxica de 0,002 ppm. O oxigênio dissolvido observado no início da manhã foi de 3 mg/L e durante a tarde 4,5 mg/L, e a vazão de 15 L/min, correspondente a uma taxa de renovação diária de 1,2%.

Na análise microbiológica, foram observadas duas colônias no Agar MacConkey: uma bactéria fermentadora de lactose e uma bactéria não fermentadora de lactose. Ambas as colônias das bactérias foram isoladas e replicadas novamente em Agar MacConkey, para identificação, apresentando o mesmo resultado.

Após o processo de replicação a bactéria não fermentadora de lactose foi identificada como *Pseudomonas aeruginosa* e a bactéria fermentadora como *Pantoea agglomerans*, por meio da característica de fermentação lenta de glicose no Agar MacConkey (Figura 1), juntamente com os testes bioquímicos: TSI (Fermentação de Glicose, Glicose e Lactose); Indol (Negativo); H₂S (Negativo); Motilidade (Positiva); Citrato (Negativo) e Catalase (Positiva) [Figura 2].

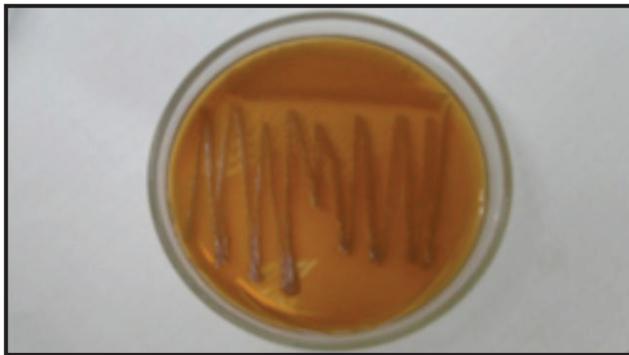


Figura 1. Bactéria de fermentação lenta de glicose isolada no meio MacConkey, identificada como *Pantoea agglomerans*, presente em amostras biológicas de peixes coletados de dois tanques em uma piscicultura do município de Campo Grande, MS.

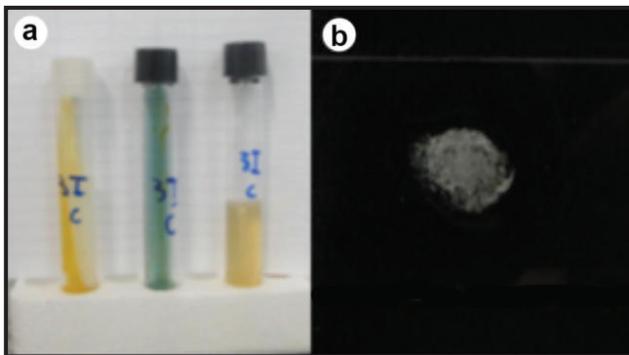


Figura 2. Testes bioquímicos: (a) TSI (Fermentação de Glicose, Glicose e Lactose), Citrato (-), H₂S (-), Motili (+), Indol (-) e (b) catalase positiva de uma bactéria presente em amostras biológicas de peixes coletados de dois tanques em uma piscicultura do município de Campo Grande, MS.

Ao exame necroscópico, os animais apresentaram congestão de vísceras de um modo geral e espessamento de guelras. O exame histopatológico dos peixes revelou que as principais alterações se encontravam no fígado: congestão e dilatação das veias central, hepatoportal e de sinusóides, presença de pigmento hemático (hemossiderina), leucocitose, vacuolização citoplasmática acentuada, focos de necrose de coagulação e colestase (Figura 3). Nas guelras foi observada intensa reação inflamatória e congestão (Figura 4).

DISCUSSÃO

A temperatura da água aferida (22,5°C) foi inferior à faixa de temperatura considerada ideal para peixes tropicais, que varia de 25 a 32°C [4] e o pH (8,3) próximo ao limite do considerado ideal [14].

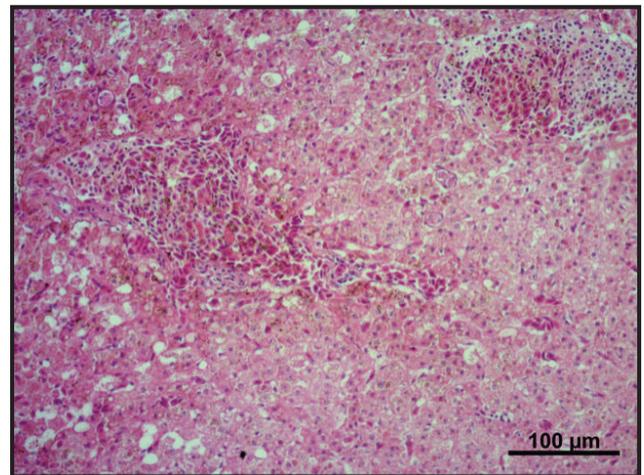


Figura 3. Fotomicrografia de fígado de pacú (*Piaractus mesopotamicus*), notar congestão e dilatação vascular, leucocitose, vacuolização citoplasmática acentuada, focos de necrose de coagulação [H&E].

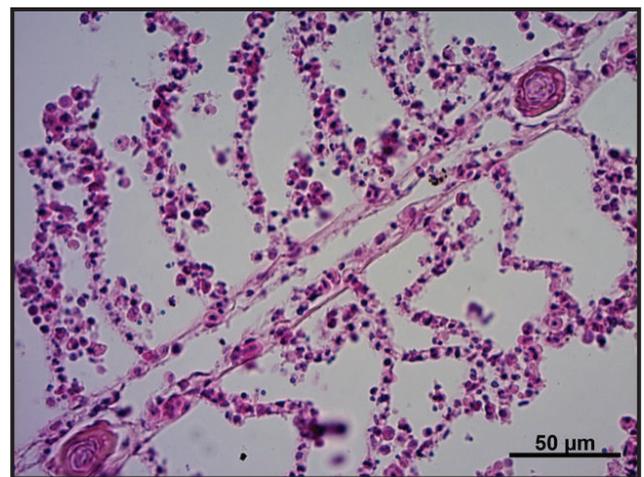


Figura 4. Fotomicrografia de guelra de pacú (*Piaractus mesopotamicus*), Presença de grande quantidade de células inflamatórias, congestão e dilatação vascular, leucocitose [H&E].

A transparência em 20 cm indicou uma alta quantidade de fitoplânctons na água [17], o que está diretamente relacionado com o baixo valor de oxigênio dissolvido encontrado no início da manhã (3 mg/L), visto que os fitoplânctons no período noturno não realizam fotossíntese e em grande quantidade podem consumir mais oxigênio do que produzem. Já ao final da tarde, a taxa de oxigênio encontrada foi maior (4,5 mg/L). Ainda, a vazão média dos tanques no período em que ocorreram as mortes era de 15 L/min, o que correspondia a uma taxa de renovação diária de 1,2%. Para viveiros escavados em sistema de produção semi-intensivos, a taxa de renovação de água recomendada é de cerca de 10% ao dia [6,17]. Essa renovação abaixo do ideal favorece o acúmulo de matéria orgânica, levando ao aumento da taxa de decomposição e liberação de nutrientes na água que propicia o desenvolvimento de fitoplânctons.

Além disso, os fatores acima contribuem para a maior concentração de amônia, elevação do pH e grande oscilação diária de oxigênio dissolvido. A amônia é o principal produto de excreção dos peixes, gerado após a assimilação das proteínas, que são a principal fonte de nitrogênio contida nas rações comerciais. O equilíbrio de amônia na água depende do pH, temperatura e salinidade. Embora a concentração de amônia tóxica tenha sido de 0,002 ppm, estando dentro do limite aceitável, quando associado ao pH de 8,3 pode afetar o equilíbrio da reação no sentido de formação de amônia [3]. As membranas celulares dos peixes são permeáveis à amônia (NH₃) por apresentarem afinidade por compostos lipofílicos, mas não o são ao amônio (NH₄), que é de natureza lipofóbica, por esse motivo, a forma amônia é tóxica para os peixes [17]. Assim, a intoxicação por amônia e a crescente prevalência de doenças infecciosas como pseudomonose entre outras, podem levar a mortandades maciças de peixes [1].

A diminuição do fluxo de água no tanque, durante o período em que foi registrada a mortalidade, provocou o aumento da quantidade de matéria orgânica acumulada, fenômeno descrito como eutrofização. Este fenômeno é caracterizado por um excesso de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, o que causa um excessivo crescimento do fitoplâncton e macrófitas

aquáticas, resultando em significativa redução da quantidade de oxigênio dissolvido, em particular nos períodos de baixa atividade fotossintética [21].

Atribuiu-se a causa da morte dos pacus à infecção oportunista por *Pantoea agglomerans* e *Pseudomonas aeruginosa* presentes nos tecidos, após as análises microbiológicas de acordo com Gavini *et al.* [10] e Mardaneh *et al.* [15]. As alterações histopatológicas encontradas neste trabalho também foram descritas, de modo geral, em outras enfermidades inespecíficas tanto de origem bacteriana como parasitária [7,22]. As lesões observadas em fígado e guelras nos pacus se assemelham às encontradas em estudo experimental [20]. Necrose hepática decorrente da infecção por *P. agglomerans* foi observada em paciente humano [9]. Estas alterações também foram descritas em uma mortandade de peixes causada por fatores ambientais associados à infecção bacteriana [1].

Doenças bacterianas afetam pisciculturas de todo mundo provocando grandes perdas na produção e prejuízos econômicos. Nos ambientes de criação de peixes deve haver equilíbrio entre a saúde do hospedeiro, a proliferação de agentes patogênicos e as condições do ambiente aquático [21]. Desse modo, fatores que promovem estresse físico e fisiológico aos peixes devem ser evitados, pois favorecem a ocorrência de doenças. A associação de medidas como boas práticas de manejo, controle eficaz, certificação sanitária e diagnóstico de rotina são fundamentais para evitar a introdução e propagação de doenças nas pisciculturas brasileiras.

CONCLUSÃO

Atribui-se a causa da morte dos peixes à infecção oportunista pela *Pantoea agglomerans* e *Pseudomonas aeruginosa* favorecida pela alta densidade de peixes no tanque e desequilíbrio na qualidade da água.

MANUFACTURERS

¹Digmed Diagnósticos Médicos Ltda. Embu-Guaçu, SP, Brazil.

²Alcon Ind e Com de Alimentos Desidratados Ltda. Camboriú, SC, Brazil.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 Abu-Elala N.M., Abd-Elsalam R.M., Marouf S., Abdelaziz M. & Moustafa M. 2016. Eutrophication, ammonia intoxication, and infectious diseases: interdisciplinary factors of mass mortalities in cultured Nile tilapia. *Journal of Aquatic Animal Health*. 28(3): 187-198.

- 2 **Ardura A., Linde A.R. & Garcia-Vazquez E. 2013.** Genetic detection of *Pseudomonas* spp. in commercial amazonian fish. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 10(9): 3954-3966.
- 3 **Baldisseroto B. 2002.** *Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura*. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 211p.
- 4 **Boyd C.E. & Tucker C.S. 2012.** *Pond aquaculture water quality management*. Boston: Springer Science & Business Media, 700p.
- 5 **Costa A.B. 2003.** Caracterização de bactérias do complexo *Aeromonas* isoladas de peixes de água doce e sua atividade patogênica. 68f. Piracicaba, SP. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade de São Paulo.
- 6 **Crepaldi D.V., Teixeira E.A., Faria P.M.C., Ribeiro L.P., Melo D.C., Carvalho D., Souza A.B. & Saturnino H.M. 2006.** Sistemas de produção na piscicultura. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 30(3): 86-99.
- 7 **De Campos C.M., De Moraes J.R. & De Moraes E.F.R. 2008.** Histopatologia de fígado, rim e baço de *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus lineatus* e *Pseudoplatystoma fasciatum* parasitados por myxosporídios, capturados no Rio Aquidauana, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 17(4): 200-205.
- 8 **Eissa A.E., Tharwat N.A. & Zaki M.M. 2013.** Field assessment of the mid-winter mass kills of trophic fishes at Mariotteya stream, Egypt: Chemical and biological pollution synergistic model. *Chemosphere*. 90(3): 1061-1068.
- 9 **Fullerton D.G., Lwin A.A. & Lal S. 2007.** *Pantoea agglomerans* liver abscess presenting with a painful thigh. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 19(5): 433-435.
- 10 **Gavini F., Holmes B., Izard D., Beji A., Bernigaud A. & Jakubczak E. 1989.** Numerical taxonomy of *Pseudomonas alcaligenes*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. mendocina*, *P. stutzeri*, and related bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 39(2): 135-144.
- 11 **Hardalo C. & Edberg S.C. 1997.** *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. *Critical Reviews in Microbiology*. 23(1): 47-75.
- 12 **IBGE. 2018.** **Produção de Aquicultura.** *Pesquisa pecuária municipal*. [Fonte: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=3940&z=t&o=21>]. [Accessed online in July 2018].
- 13 **Kratz A., Greenberg D., Barki Y., Cohen E. & Lifshitz M. 2003.** *Pantoea agglomerans* as a cause of septic arthritis after palm tree thorn injury; case report and literature review. *Archives of Disease in Childhood*. 88(6): 542-544.
- 14 **Kubtz A. 2003.** *Qualidade da água no cultivo de peixes e camarões*. Jundiá: Kubitz, 229p.
- 15 **Mardaneh J. & Dallal M.M.S. 2018.** Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of *Pantoea (Enterobacter) agglomerans* isolated from consumed powdered infant formula milk (PIF) in NICU ward: First report from Iran. *Iranian Journal of Microbiology*. 5(3): 263.
- 16 **Moraes F.R. & Martins M.L. 2004.** Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. In: Cyrino J.E.P., Urbinati E.C., Fracalossi D.M. & Castagnolli N. (Eds). *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. São Paulo: Tecart, pp.343-386.
- 17 **Rodrigues A.P.O., Lima A., Alves A., Rosa D., Torati L. & Santos V. 2013.** *Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos*. Brasília: Embrapa, 440p.
- 18 **Saticioglu I.B., Duman M. & Altun S. 2018.** Antimicrobial resistance and molecular characterization of *Pantoea agglomerans* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Microbial Pathogenesis*. 119: 131-136.
- 19 **Siwakoti S., Sah R., Rajbhandari R. S. & Khanal B. 2018.** *Pantoea agglomerans* infections in children: Report of two cases. *Case Reports in Pediatrics*. 2018(4158734): 1-3.
- 20 **Thomas J., Thanigaivel S., Vijayakumar S., Acharya K., Shinge D., Seelan T.S., Mukherjee A. & Chandrasekaran N. 2014.** Pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* in *Oreochromis mossambicus* and treatment using lime oil nanoemulsion. *Colloids Surf Biointerfaces*. 116(2014): 372-377.
- 21 **Val A.L., Almeida-Val V.M.F. & Randall D.J. 2005.** *The physiology of tropical fishes*. London: Elsevier, 400p.
- 22 **Winckler L.Z., Santos R.M., Ferreira M.W., Santos F.M., Leite T.C. & de Andrade, G.B. 2015.** Mortalidade de tambacus (*Colossoma macropomum* x *Piaractus mesopotamicus*) infectados por *Edwardsiella tarda*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 52(1): 63-67.