



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Departamento de Sistemática e Ecologia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Zoologia

**DOENÇAS ASSOCIADAS AO CAVALO-MARINHO *HIPPOCAMPUS REIDI* (TELEOSTEI
SYNGNATHIDAE) EM SISTEMA DE CULTIVO EXPERIMENTAL, COM ÊNFASE EM
INFECÇÕES BACTERIANAS**

José Araújo Souto Neto.

João Pessoa, Paraíba
Maio de 2016

Universidade Federal da Paraíba

Centro de Ciências Exatas e da Natureza

Departamento de Sistemática e Ecologia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Zoologia

**DOENÇAS ASSOCIADAS AO CAVALO-MARINHO *HIPPOCAMPUS REIDI* (TELEOSTEI
SYNGNATHIDAE) EM SISTEMA DE CULTIVO EXPERIMENTAL, COM ÊNFASE EM
INFECÇÕES BACTERIANAS**

JOSÉ ARAÚJO SOUTO NETO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia), da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Zoologia.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Ierecê Maria de Lucena Rosa

João Pessoa, Paraíba

Maior de 2016

S726d Souto Neto, José Araújo.

Doenças associadas ao cavalo-marinho Hippocampus Reidi (*Teleostei Syngnathidae*) em sistemas de cultivo experimental, com ênfase em infecções bacterianas / José Araújo Souto Neto. - João Pessoa, 2016.

61 f.: il. -

Orientadora: Ierecê Maria de Lucena Rosa.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN

1. Zoologia. 2. Cavalos-Marinheiros - Cultivo. 3. Aquicultura. 4. Patógenos. 5. Syngnathidae. I. Título.

UFPB/BC

CDU: 59(043)

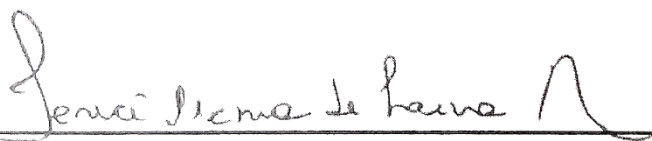
JOSÉ ARAÚJO SOUTO NETO

DOENÇAS ASSOCIADAS AO CAVALO-MARINHO *HIPPOCAMPUS REIDI*
(TELEOSTEI SYNGNATHIDAE) EM SISTEMA DE CULTIVO EXPERIMENTAL,
COM ÊNFASE EM INFECÇÕES BACTERIANAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia), da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Zoologia.

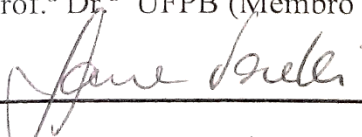
Data: _____

Resultado: _____



Ierecê Maria de Lucena Rosa, Prof.^a Dr.^a, UFPB

Thelma Lúcia Pereira Dias, Prof.^a Dr.^a UFPB (Membro interno)



Jane Enisa Ribeiro Torelli de Souza, Dr.^a UFPB (Membro externo - suplente)

À Francisca Marinho, minha Vó Nena.

In memoriam

AGRADECIMENTOS

Sem sombra de dúvidas, esse é pra mim o tópico mais importante desse trabalho e que merece um esforço final pra redigir que automaticamente está sendo convertido em sensação de dever cumprido pra todos que nele são citados, pois de fato, sem a contribuição de todos vocês nada disso teria sido possível.

Agradeço...

A toda minha família, em especial, meus pais, Beatriz e Josélio, meu irmão Fillipe, aos meus avós, e minhas tias e tios, Misa, Nêga, Muma, Di, Tó, por todo amor incondicional e incentivo que sempre recebi, amo voes incondicionalmente.

A minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Ierecê, pelo voto de confiança na execução desse trabalho, por não abrir mão de me ajudar em qualquer coisa sempre que possível e por todo ensinamento desde meu segundo período da graduação, a vivência que tive como lapequeiro é algo que vou levar pra sempre, foram e estão sendo os anos mais conturbados, intensos, difíceis e porque não, os melhores que já vivi até hoje.

As minhas coorientadoras. Prof.^a Dr.^a Brígida Lucena por sempre ter a maior paciência do mundo em me ensinar a trabalhar com bactérias e com biologia molecular e principalmente por pontuar meus erros de forma que eu aprendesse com eles. Trabalhar na bancada esses dois anos foram um tanto claustrofóbicos pra esse quase zoólogo, mas definitivamente plantaram em mim o início de uma paixão pela biomol e uma admiração imensa, não que eu vá abrir mão de ir pra campo, mas enfim, muito, muito obrigado por tudo. Prof.^a Dr.^a Tacyana Oliveira, “Tacy”, por me “adotar” como orientando do Lapec e do Lecom, contribuindo nesse trabalho desde o contato com Brígida, na elaboração do projeto, nas revisões de texto enfim sua forma exigente de ser e puxões de orelhas em todas essas etapas foram fundamentais pra que esse trabalho esteja sendo finalizado hoje, eu só tenho a agradecer de coração.

Aos membros da banca, Pr.^{as} Thelma Dias, Jane Enisa por aceitarem o convite e pelas contribuições durante a arguição, bem como a professora Maria Raquel, pelas sugestões encaminhadas posteriormente via e-mail devido não poder comparecer a banca.

A todos os professores e colegas do PPGCB – Zoologia (UFPB).

A Prof.^a Ma. Estefânia Garcia, por sempre estar disposta a tirar dúvidas e ajudar em tudo que estava ao seu alcance na época das extrações no CCS.

A Kass por aguentar todos os meus desesperos, ataques de pânico e estresse desde sempre e principalmente nesses dois últimos anos, sei que não foi fácil rs, mas vamos nos acostumando, vai ser assim por muito tempo, afinal pisciano sofre viu. Muito, muito obrigado, sem você isso definitivamente não teria sido possível.

A Aline e Mari, essa “amazing people” que eu tanto amo e que tanto me faz bem, que venham muitas tardes de verão em Pipa, ou seja onde for, podem ser manhãs de outono em Londres também. Na companhia de vocês (e Kass) rir dos problemas nunca me pareceu tão fácil. A Aline um agradecimento especial, sem sua ajuda (you know what i’m talking about, right?) esse trabalho não teria saído do papel, serei eternamente grato.

A Livia, irmã gêmea de cabelo, que até os deuses duvidam como essa amizade perdura até hoje. Por sempre acreditar em mim e saber me botar pra cima quando necessário (atenção no: quando necessário rs). Te amo, rolha.

A Josias, por sempre estar a disposição na coordenação da pós, ajudando em tudo que fosse necessário. Você é um exemplo de competência em tudo que faz.

As todos que fizeram ou fazem parte do “Laboratório das 4 mulheres”, Prf^{as} Dr^{as} Daniela e Enelise, Gabi, Raissa, Maria Helena, Layanne, Dani, Matheus, Glacy, Ignácio, Kamila, Nath, Thony, Felipi, Beth, muito obrigado por me receberem tão bem, de fato me senti parte do laboratório, vocês são demais.

A todos que conheci desde que entrei na bio e no Lapec e vou levar comigo pra sempre pra onde eu for. Lua, Lari, Ju, Paty, Gabi Defávare, Camis, Jéh, Rebeca, obrigado por tudo.

A Bono e Bartô, Yankee e Maya, válvulas de escape pro meu estresse, fábricas de abraços ambulantes, e donos das melhores lambidas e focinhos gelados, muito obrigado.

“Sempre há alguma coisa fermentando, à
espera de tomar nosso lugar. Isso porque
não temos um solo firme sob os nossos
pés. Não temos sequer areia sob os pés.
Nós *somos* areia.”

Jostein Gaarder

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
1.1.	Aquicultura de organismos ornamentais marinhos	15
1.2.	Cavalos marinhos como peixes ornamentais marinhos.....	16
1.3.	Entraves para o cultivo de cavalos-marinhos.....	17
1.4.	Doenças associadas a cavalos-marinhos em cativeiro.....	19
2.	OBJETIVOS.....	24
2.1.	Geral	24
2.2.	Específicos	24
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1.	Sistema de cultivo e animais amostrados.....	25
3.2.	Registro de doenças	26
3.3.	Amostragem de lesões cutâneas nos cavalos-marinhos e da água dos sistemas	26
3.4.	Isolamento bacteriano	27
3.5.	Extração de DNA dos isolados bacterianos.....	27
3.6.	PCR e sequenciamento.....	28
3.7.	Análise de dados.....	28
4.	RESULTADOS	30
4.1.	Registro de doenças, mortalidade e qualidade da água nos sistemas de manutenção 30	
4.2.	Descrição dos eventos de infecção e sintomas	39
4.3.	Patógenos associados às lesões e amostras de água.....	41
5.	DISCUSSÃO	44
6.	RECOMENDAÇÕES	48
7.	CONCLUSÕES	50
	REFERÊNCIAS.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

RESULTADOS

Figura 1: Número de registros das principais doenças apresentadas por cavalos-marinhos da espécie *Hippocampus reidi* ao longo de cinco anos no cultivo experimental do Laboratório de Peixes – Ecologia e Conservação (LAPEC) – Universidade Federal da Paraíba. DB: doença das bolhas, DE: dificuldades de equilíbrio, MS: morte súbita sem sinais premonitórios.....32

Figura 2: Exemplares de cavalos-marinhos doentes da espécie *Hippocampus reidi* mantidos em cultivo experimental do Laboratório de Peixes – Ecologia e Conservação (LAPEC) – Universidade Federal da Paraíba. A, B, C, D e H – Exemplos de dermatites; F e G – Indivíduo com dificuldades de equilíbrio e bexiga natatória inflada.....33

Figura 3: Média dos registros de indivíduos doentes de cavalos-marinhos da espécie *Hippocampus reidi* ao longo de cinco anos, no cultivo experimental do Laboratório de Peixes – Ecologia e Conservação (LAPEC) – Universidade Federal da Paraíba. $F_{4;49} = 3.470$, $p = 0,01$; *post hoc* Tukey, $p < 0,05$: grupos demonstrados através da numeração sobre as barras.....35

Figura 4: Média de indivíduos doentes de cavalos-marinhos da espécie *Hippocampus reidi* mantidos em aquários com Sistemas de Circulação Fechada (SCF) e Sistemas Isolados sem circulação (SI), no cultivo experimental do Laboratório de Peixes – Ecologia e Conservação (LAPEC) – Universidade Federal da Paraíba. $t = 3.602$, g.l. = 106, $p < 0,01$36

Figura 5: Média da variação de compostos nitrogenados, Nitrito (A) e Amônia (B), em sistemas de aquários com Sistemas de Circulação Fechada (SCF) e Sistemas Isolados sem circulação (SI), no cultivo experimental de cavalos-marinhos da espécie *Hippocampus reidi* no Laboratório de Peixes – Ecologia e Conservação (LAPEC) – Universidade Federal da Paraíba. (Nitrito, $t = -5.574$, g.l. = 94, $p < 0,01$; Amônia, $U = 139.000$, g.l. = 100, $p < 0,01$).....37

Figura 6: Média da variação de amônia em aquários com Sistemas de Circulação Fechada (SCF) (A) e Sistemas Isolados sem circulação (SI) (B) entre períodos com indivíduos doentes (SCF/com e SI/com) e sem indivíduos doentes (SCF/sem e SI/sem) de cavalos-marinhos da espécie *Hippocampus reidi*, no Laboratório de Peixes – Ecologia e Conservação (LAPEC) – Universidade Federal da Paraíba. (Wilcoxon. SCF, $T = 0.00$, g.l. = 8, $p < 0,00$; SI, $T = 0.00$, g.l. = 5, $p < 0,03$).....37

Figura 7: Registros de indivíduos da espécie de cavalo-marinho *Hippocampus reidi* doentes, mantidos em cultivo experimental no Laboratório de Peixes – Ecologia e Conservação (UFPB) ao longo dos meses dos anos de 2011 a 2015 e médias dos valores de nitrito e amônia dissolvidos nos sistemas de circulação fechado (SCF). Eixo esquerdo: Número de indivíduos doentes. Eixo direito: Concentração de nitrito e amônia.....

Figura 8: Registros de indivíduos da espécie de cavalo-marinho *Hippocampus reidi* doentes, mantidos em cultivo experimental no Laboratório de Peixes – Ecologia e Conservação

(UFPB) ao longo dos meses dos anos de 2011 a 2015 e médias dos valores de nitrito e amônia dissolvidos nos sistemas de aquários isolados sem filtragem (SI). Eixo esquerdo: Número de indivíduos doentes. Eixo direito: Concentração de nitrito e amônia.....39

Figura 9: Cauda de exemplares de cavalo-marinho da espécie *Hippocampus reidi* pertencentes à população para cultivo experimental do Laboratório de Peixes – Ecologia e Conservação (LAPEC – UFPB) demonstrando a evolução de uma lesão descamativa em um dos indivíduos afetados, com crescimento e perda de parte da cauda, da esquerda para direita (Lesão na cauda tipo I).....41

Figura 10: Cauda de exemplar de cavalo-marinho da espécie *Hippocampus reidi* pertencentes à população para cultivo experimental do Laboratório de Peixes – Ecologia e Conservação (LAPEC – UFPB) com lesão ulcerativa superficial (Lesão na cauda tipo II).....41

Figura 11: Vista lateral (esquerda) e ventral (direita) de exemplar macho de cavalo-marinho da espécie *Hippocampus reidi* com lesão ulcerativa na bolsa incubadora, pertencente à população para cultivo experimental do Laboratório de Peixes – Ecologia e Conservação (LAPEC – UFPB).....42

Figura 12: Espécies de bactérias identificadas em três tipos de lesões (lesão na cauda tipo I e II e lesão na bolsa incubadora) de cavalos marinhos mantidos em SCF em cultivo experimental no Laboratório de Peixes – Ecologia e Conservação (LAPEC) da Universidade Federal da Paraíba.....44

Figura 13: Espécies de bactérias identificadas provenientes da água de SCF durante eventos de infecção em dois tipos de lesões (lesão na cauda tipo II e lesão na bolsa incubadora) de cavalos marinhos mantidos em SCF em cultivo experimental no Laboratório de Peixes – Ecologia e Conservação (LAPEC) da Universidade Federal da Paraíba.....44

ÍNDICE DE TABELAS

RESULTADOS

Tabela 1: Média do número de indivíduos por aquário (Ind./aq.), de litros de água por animal (animal/L) e percentual de mortalidade de indivíduos (28,7%) da espécie de cavalo-marinho *Hippocampus reidi* mantidos em cultivo experimental no Laboratório de Peixes – Ecologia e Conservação (UFPB), ao longo de cinco anos de cultivo. Fatores adversos não controlados no cultivo também são apresentados como troca no fornecedor de alimento em março, diminuição na oferta de pós-larva em consequência da troca de fornecedor (julho à novembro), introdução de *Artemia salina* e filtragem ultravioleta do SD desativado durante o mês de janeiro para ambos os sistemas (SCF e SI) e infestação de copépodas no SCF. ^ Significa valor total, não representa média.....34

Tabela 2: Eventos de infecção cutânea em indivíduos adultos da espécie *Hippocampus reidi* em condições de cultivo experimental, mantidos em SCF. Características das lesões, características abióticas e unidades formadoras de colônia (UFC) por centímetro quadrado da lesão. (Ind.: Indivíduo; M – Macho, F – Fêmea; Temp.: Temperatura; Sal.: Salinidade).....40

RESUMO

O presente estudo é uma retrospectiva de 5 anos de cultivo experimental de cavalos-marinhos da espécie *Hippocampus reidi*, caracterizando e quantificando as principais doenças da espécie em cativeiro em associação com parâmetros da qualidade da água em dois tipos de sistemas de manutenção da espécie (SCF – Sistema de Ciculação Fechada e SI – Sistema de aquários isolados sem filtragem) e uma avaliação de infecções bacterianas associadas a lesões cutâneas e a água durante o período de um ano. Foram registrados 192 cavalos-marinhos doentes no cultivo experimental ao longo dos 5 anos, nos quais indivíduos com dermatites foram os mais frequentes, representando 46,3% dos casos, gerando quadros clínicos severos que incluem lesões ulcerativas, manchas esbranquiçadas ao longo do corpo e descamação de tecido. Doenças das bolhas, dificuldades de equilíbrio e morte súbita foram outras doenças observadas, porém em menor proporção. Foram coletadas, entre abril/2014 e abril/2015, amostras de esfregaço por meio de *swab* de 2 tipos de lesões ulcerativas na região da cauda e 1 tipo de lesão ulcerativa na região da bolsa incubadora de cavalos-marinhos provenientes do cultivo experimental e amostras de água provenientes dos sistemas de distribuição (SD) de água, das quais totalizam 119 isolados bacterianos. As cepas isoladas foram identificadas a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA por meio de buscas de similaridade nos bancos de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information) e RDP (Ribosomal Database Project). Dentre os isolados, foram identificadas um total de 12 espécies bacterianas distintas, distribuídas em 7 famílias, cujas famílias mais abundantes em lesões cutâneas foram Micrococcaceae (38,2%), Vibrionaceae (25,5%) e Bacillaceae (23,4%) e em isolados da água Pseudoalteromonadaceae (51,4%) e Bacillaceae (34,2%). O número de indivíduos doentes nos sistemas de manutenção está diretamente associado a aumento nos níveis de nitrito e amônia e de bactérias patogênicas ou patogênicas oportunistas.

Palavras-chave: patógenos, aquicultura, sintomas, Syngnathidae.

ABSTRACT

This study is a retrospective of five years of experimental cultivation of a seahorse specie *Hippocampus reidi*. The aim was to characterize and quantify the main diseases of the specie in captivity, associated with water quality parameters in two types of systems (SCF - Closed System Circulation and SI – Isolated unfiltered system), as well an assessment of bacterial infections associated with skin lesions and water during one year. It was recorded 192 ill seahorses in the experimental cultivation over the five years in which individuals with dermatitis were the most frequent, occurring in 46.3% of cases and leading to severe medical conditions as epidermal ulceration, whitish spots along the entire organism and tissue desquamation. Other illnesses as gas bubbles diseases, balance difficulties and sudden death were also observed but to a lesser extent. Samples of ulcerative lesions were collected, using swabs, between april/14 and april/15 of two 2 classes of lesions in the tail and one type in the brood pouch from experimental cultivation seahorses. Samples of water from the water distribution system were also gathered. A total of 119 bacterial strains were isolated. Isolated Bacteria were identified using the 16S sRNA gene according to similarity searches in databases NCBI (National Center for Biotechnology Information) and RDP (Ribosomal Database Project). Among isolated bacterial strains, it was identified 12 species of Bacteria, distributed in seven families. The main families identified in skin lesions of *Hippocampus reidi* were Micrococcaceae (38.2%), Vibrionaceae (25.5%) and Bacillaceae (23.4%), while the main families founded in water were Pseudoalteromonadaceae (51,4%) and Bacillaceae (34,2%). The number of ill individuals in maintaining systems were directly associated with increased levels of nitrite and ammonia, as well pathogenic bacteria or opportunistic pathogens.

Key words: pathogens, aquaculture, symptoms, Syngnathidae.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aquicultura de organismos ornamentais marinhos

A indústria de aquarismo corresponde ao cultivo e a um amplo e diverso comércio que envolve milhares de espécies de peixes e invertebrados marinhos e de água doce (MILLER-MORGAN, 2010), com estimativas muito falhas e potencialmente subestimadas, devido ao monitoramento ineficaz (RHYNE et al., 2016). Tais atividades vêm apresentando um crescimento mundial de aproximadamente 14% ao ano, cuja parte mais representativa abastece países em desenvolvimento através do comércio internacional (PADILLA e WILLIAMS, 2004). Estados Unidos, Europa Ocidental e Japão caracterizam-se como os maiores importadores de espécies ornamentais, dentre os quais apenas os Estados Unidos importam mais de 80% do comércio mundial de corais (LIVENGOOD e CHAPMAN, 2011; TLUSTY, 2012).

Em relação a espécies de peixes, grande parte da produção de ornamentais tem como foco espécies de água doce, tendo em vista que a manutenção de espécies marinhas em cativeiro é bem menos avançada (DAWES, 1998). Nesse contexto, a cada 800 espécies marinhas comercializadas, 700 são retiradas da natureza, sendo vendidas a uma média de preços dez vezes superior aos valores cobrados por espécies de água doce (HOFF, 1996, DAWES, 1998). Diante da alta extração de espécimes da natureza, alguns estados e países passaram a estabelecer cotas de captura, como o Estado da Flórida, as Bahamas e Brasil, por exemplo, os quais estabeleceram cotas de exportação para espécies permitidas (TLUSTY, 2002; SAMPAIO e NOTTINGHAM, 2008). Estima-se que, até 2003, mais de 50% do abastecimento mundial de peixes ornamentais vêm do Indo-Pacífico (OLIVIER, 2003) e 60% dos peixes nessa indústria são originários de países em desenvolvimento (BARTLEY, 2000).

O cultivo de peixes e invertebrados ornamentais é reconhecido como uma alternativa viável à coleta de indivíduos na natureza (TLUSTY, 2002; KOLDEWEY e MARTIN-SMITH, 2010;), uma vez que visa abastecer o comércio diminuindo pressões nas populações naturais. O papel da aquicultura na redução de captura de organismos do ambiente natural se torna ainda mais relevante no caso de espécies ameaçadas, como é o caso dos cavalos-marinhos.

1.2. Cavalos marinhos como peixes ornamentais marinhos

O interesse por cavalos-marinhos como peixes ornamentais dá-se particularmente pela morfologia e comportamentos diferenciados que apresentam, tais como corpo formado por uma série de anéis ósseos e a boca localizada na extremidade de um focinho tubular, corte altamente ritualizada e cuidado parental exercido pelos machos (NELSON, 2006; LOURIE et al, 1999). Além disso, a cabeça desses animais forma um ângulo reto em relação ao eixo do corpo, resultando em um padrão de natação vertical único (LOURIE et al., 2004; KUITER et al., 2009).

Outra característica marcante do grupo é a presença de uma cauda preênsil, utilizada geralmente para se prender a substratos de apoio, como algas e corais (LOURIE et al., 2004; KUITER et al., 2009), e a presença de uma bolsa incubadora nos machos, das quais os filhotes nascem como miniaturas de indivíduos adultos, totalmente independentes (LOURIE et al., 1999; FOSTER e VINCENT, 2004). Além disso, os cavalos-marinhos também apresentam grande variação no padrão de colorido, como também podem desenvolver filamentos dérmicos, para a camuflagem, a qual é utilizada tanto para evitar a predação como para capturar presas por emboscada (LOURIE et al., 1999, 2004). Os complexos rituais de corte e acasalamento, que apresentam comportamentos incluem entrelaçamento de caudas e movimentos paralelos e em círculos entre machos e fêmeas (FOSTER e VINCENT, 2004), também são fatores que contribuem para o interesse de aquaristas e consequente comércio no âmbito nacional e internacional (BAUM e VINCENT, 2005; ROSA et al, 2011)

Embora a participação de espécimes cultivados tenha sido cada vez maior no comércio mundial de cavalos-marinhos para aquarofilia (KOLDEWEY e MARTIN-SMITH, 2010), sendo relatado um aumento considerável de participação na Austrália (MARTIN-SMITH e VINCENT, 2006) e Ásia (NIJMAN, 2010), no Brasil, esse comércio baseia-se essencialmente na extração desses animais do ambiente natural, uma vez que o cultivo de cavalos-marinhos é uma atividade recente e ainda incipiente (ROSA et al, 2011). Aliado a isso, temos ainda as capturas diretas, capturas incidentais, o comércio internacional e a degradação de seus habitats preferenciais, que levaram os cavalos-marinhos a serem considerados globalmente ameaçados (LOURIE et al., 2004; VINCENT et al., 2011). De fato, 40 das 48 espécies de *Hippocampus* encontram-se incluídas na lista vermelha da IUCN (2016) e todo o gênero *Hippocampus* foi incluído, em 2004, no Apêndice II da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Fauna e Flora Selvagens em Perigo de Extinção (CITES), o que requer o monitoramento e

controle do comércio internacional desses animais por parte dos 181 países signatários art. IV da convenção.

No Brasil, todas as espécies de cavalos-marinhos estão presentes na mais recente Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção - Peixes e Invertebrados Aquáticos, anexo I da Portaria nº 445, de 17 de dezembro de 2014, do Ministério do Meio Ambiente, e, em 2011, foi publicada uma proposta de Plano Nacional de Gestão para o Uso Sustentável dos Cavalos-Marinhos (DIAS NETO, 2011).

No país, o comércio de cavalos-marinhos para aquarioria ganhou grande importância a partir da década de 90, passando a ser componente significativo da exportação de peixes ornamentais no país (MONTEIRO-NETO et al., 2003; ROSA, 2005; ROSA et al, 2011). De fato, o Brasil tem posição ativa no comércio internacional de cavalos-marinhos, sendo um dos maiores exportadores de indivíduos vivos para fins de aquarismo no mundo, e o maior da América Latina (BAUM e VINCENT, 2005), particularmente da espécie *Hippocampus reidi* (ROSA et al., 2011).

Devido à vulnerabilidade dos cavalos-marinhos à sobre-exploração (LOURIE et al., 2004; MAI e ROSA, 2009; ROSA et al., 2005), a aquicultura pode ser uma alternativa à extração de espécimes de populações naturais (KOLDEWEY e MARTIN-SMITH, 2010; ROSA et al, 2011). Entretanto, ressalta-se que o cultivo não deve ser visto como a única ação a ser explorada na conservação e manejo dos cavalos-marinhos (KOLDEWEY e MARTIN-SMITH, 2010), sendo essencial assegurar a manutenção das populações no ambiente natural e proteger os ecossistemas dos quais fazem parte. Além disso, a manutenção de cavalos-marinhos em cativeiro e, conseqüentemente, o estabelecimento de cultivos viáveis, é considerada uma atividade de alto nível de dificuldade, particularmente devido a problemas de vulnerabilidade a doenças e dieta inadequada, que ainda tornam o cultivo destes organismos economicamente inviável na maioria dos casos (FAN, 2005).

1.3. Entraves para o cultivo de cavalos-marinhos

Apesar de muito apreciadas pelo comércio aquarista, as características únicas apresentadas pelos cavalos-marinhos podem constituir entraves relevantes à manutenção em

cativeiro. Desta forma, os complexos padrões de comportamento e aspectos ecológicos e morfológicos desse grupo devem ser levados em consideração durante o estabelecimento de protocolos de cultivo.

O comportamento alimentar e morfologia do trato digestório dos cavalos-marinhos, por exemplo, são de grande relevância, particularmente no caso de indivíduos recém-nascidos. Apesar destes apresentarem aparato bucal e o corpo bastante similares aos dos adultos (LEISEN et al, 2010a; 2011b; ROSS et al, 2010; 2011; VAN WASSENBERGH et al, 2009), altas taxas de mortalidade são registradas neste estágio de vida (PAYNE e RIPPINGALE, 2000), seja pelo fato de alguns recém-nascidos ainda não terem iniciado sua alimentação devido ao tamanho do alimento ofertado, ou por serem incapazes de digerir completamente seu alimento (PAYNE e RIPPINGALE, 2000, WOODS, 2003; PLANAS et al., 2009). No intestino dos cavalos-marinhos, a digestão ocorre parcialmente, uma vez que esses peixes não apresentam estruturas para mastigação nem estômago verdadeiro (BERGET e WAINWRIGHT, 1997). Assim, a presença de alimento em tamanho apropriado (TEIXEIRA e MUSICK, 2001; OLIVOTO et al., 2011), bem como a qualidade e quantidade adequadas são essencialmente necessários desde o início do cultivo (SHENG et al, 2006; WOODS, 2003; WONG, 2003; OTERO-FERRER et al., 2012).

Outro fator a ser considerado é a capacidade natatória desses animais. Diferente de outros grupos de peixes, os cavalos-marinhos não possuem nadadeira caudal, resultando em baixa propulsão para a natação, a qual é promovida essencialmente pela nadadeira dorsal (BRUNER e BARTOLINO, 2008), além de preferirem áreas da parte inferior do aquário, substratos de apoio verticais e plantas naturais, quando mantidos em cativeiro (FALEIRO, 2008). Tais peculiaridades remetem a necessidades específicas no que diz respeito a dimensões dos aquários e principalmente à velocidade de circulação de água em um contexto de cultivo (KOLDEWEY, 2005). A baixa mobilidade desses animais também pode ser associada à íntima relação que eles apresentam com o ambiente circundante, através da utilização de substratos de apoio (FOSTER e VINCENT, 2004). Desta forma, a disponibilidade, o tipo e a cor do substrato de apoio podem afetar a mudança de coloração de cavalos-marinhos (e.g. *H. abdominalis*, WARDLEY, 2001; *H. erectus*, LIN et al, 2009).

Sabe-se, ainda, que anterior à utilização de substratos de apoio, cavalos-marinhos recém-nascidos apresentam uma fase planctônica, com diferentes durações entre as espécies (GIWOJNA, 1990). Esta fase é considerada crucial por alguns autores para o cultivo de

cavalos-marinhos (PAYNE e RIPPINGALE, 2002; MURUGAN et al., 2009) uma vez que representa o período de maior mortalidade para os jovens (LIN et al., 2008).

Observa-se, também, que diferentes condições de cultivo desses animais, bem como a densidade de animais por aquário, têm relação direta com o comportamento natural, social e reprodutivo dos cavalos-marinhos (FALEIRO et al, 2008). Esses aspectos reforçam uma necessidade de atenção no que diz respeito à qualidade e circulação de água, iluminação, disponibilidade de substratos de apoio e tanques apropriados para a manutenção em cativeiro desses animais, o que em grande maioria não é feito nos cultivos comerciais, tendo em vista que tais parâmetros encarecem os mesmos (NOGUEIRA, 2007; VINCENT e KOLDEWEY, 2006).

Dentre os diversos tipos de sistemas de cultivo, sistemas de circulação fechada vêm aparentemente superando algumas barreiras enfrentadas na aquicultura e surgindo como uma forma mais sustentável de cultivo (SCHREIER et al., 2010). O tratamento de efluentes nesses sistemas passa por alguns passos de filtragem, divididos principalmente em filtragem e esterilização física (*skimmers*, malhas de micra, manta acrílica ‘perlon’, filtros com radiação UV) e filtragem biológica (utilização de bactérias nitrificantes para retirada de compostos nitrogenados (ATTRAMANDAL et al., 2012). Entretanto, a grande maioria de projetos de cultivo de cavalos-marinhos em escala comercial ainda enfrenta dificuldades graves relacionadas à mortalidade em massa de jovens devido à alimentação inadequada e ao surgimento de doenças durante a manutenção em cativeiro, destacando-se infecções bacterianas, fúngicas, parasitárias e embolias gasosas (WILSON e VINCENT, 1999; ALCAIDE et al., 2001; KOLDEWEY, 2005; LEPAGE et al., 2015).

1.4. Doenças associadas a cavalos-marinhos em cativeiro

As doenças são uma das principais causas de mortalidade de cavalos-marinhos adultos em cativeiro (WILSON e VINCENT, 1999; LEPAGE et al., 2015), e registros específicos na família Syngnathidae são escassos, principalmente se comparados a outros grupos de teleósteos (e.g. Salmonidae, Cyprinidae e Ictaluridae; NOGA, 2011). Abordagens que avaliem eventos de mortalidade em cativeiro em uma escala temporal mais ampla, como o caso de

LePage e colaboradores (2015), que analisaram os tipos de doenças e mortalidade em *H. kuda* durante 13 anos no Zoológico de Toronto, são escassos.

Dentre os principais quadros clínicos registrados para os singnatídeos, defeitos congênitos (GARLAND et al., 2002; BLANCO et al., 2012), neoplasias (WILLENS et al, 2004) e nefrolitíase (LEWISCH et al, 2013) são os menos frequentes. A doença das bolhas (*gas bubble disease*), cujas causas estão relacionadas a mudanças bruscas de temperatura e acúmulo de gás na água (LEPAGE et al, 2014), é mais amplamente reportada, sendo associada a sintomas como dificuldades de natação, equilíbrio e orientação (MONTEIRO et al, 2003; BOMBARDINI et al, 2006; LIN, LIN e HUANG, 2010; LEPAGE et al, 2014, 2015; ZHANG e QIN, 2015). Em relação a parasitoses, metazoários extraintestinais compõem o grupo mais comumente encontrado, envolvendo geralmente trematódeos e cestódeos, causando extensas respostas do hospedeiro, incluindo hiperplasia epitelial e cecrose, com atrofia multifocal de células epiteliais. Protozoários e dinoflagelados também já foram encontrados, porém em uma frequência muito menor que metazoários (KOLDEWEY et al, 2005). Casos de infecções fúngicas causando micoses cutâneas sistêmicas também vêm sendo descritas dentro da família Syngnathidae (BRASIOLA, 1979; VINCENT e CLIFTON HADLEY, 1989; NYAOKE et al, 2009; BOMBARDINI et al, 2006), entretanto, as condições clínicas e patológicas desses isolados ainda precisam ser determinadas.

Fatores como desnutrição, estresse de captura, alta densidade de indivíduos e má qualidade da água podem resultar em peixes imunocomprometidos (KINKELIN et al, 1991; WILSON; VINCENT, 1998; CASTRO et al., 2008), susceptíveis também a infecções bacterianas (ALCAIDE et al, 2001; VINCENT; CLIFTON-HADLEY, 1989; KOLDEWEY, 2005; VINCENT; KOLDEWAY, 2006; ROSA et al, 2005, 2006).

Sistemas de recirculação de água em cultivo abrigam uma ampla comunidade microbiana (SUGITA et al., 1992). Alguns destes microrganismos, especialmente bactérias, são capazes de metabolizar compostos orgânicos, desempenhando papel importante na manutenção da qualidade da água (LEONARD et al., 2000, 2002; NAM et al., 2000). Entretanto, a microbiota bacteriana pode ser caracterizada por patógenos presentes no sistema de recirculação, causando problemas à população cultivada (SHARRER et al., 2005).

Nesse contexto, sabe-se que vários parasitas e bactérias podem estar naturalmente presentes na superfície do corpo e brânquias de peixes com estado nutricional e fisiológico devidamente ajustado ao ambiente natural, e só em condições favoráveis proliferam-se e

tornam-se patógenos, resultando, então, na manifestação de doenças (ROBERTS e BULLOK, 1980).

O termo microbiota refere-se consensualmente a uma determinada comunidade de microrganismos que ocupam um ecossistema específico (MUELLER et al, 2012), o qual pode constituir um meio de colonização abiótico ou biótico. Neste último, o estabelecimento desses microrganismos em determinadas estruturas corpóreas (órgãos e tecidos, por exemplo) é bastante complexo e é resultado de uma íntima associação ao longo da história desses organismos (AUSTIN, 2000). A presença de células flama distribuídas na epiderme de *H. kuda* (BEREITERV-HAHN et al, 1980) pode ser exemplo dessa interação, uma vez que tais células apresentam cápsulas mucosas proeminentes (20-40µ) capazes de suportar crescimento microbiano. Entretanto, nada se sabe em relação à presença de tais células em outras espécies de cavalos-marinhos.

A despeito da importância de se determinar a diversidade bacteriana em sistemas de cultivo, dada a importância destes microrganismos tanto para a manutenção da qualidade da água como em relação a sua atuação como patógenos, os sistemas bacterianos enfrentam desafios únicos se comparados aos encontrados no âmbito da Botânica e da Zoologia (COHAN e PERRY, 2007). Isso se deve especialmente à escassez de diferenças morfológicas que possam ajudar a demarcar espécies estreitamente relacionadas (COHAN e PERRY, 2007) e ao fato de que as técnicas tradicionais de identificação com utilização de meios de cultura não seletivos e seletivos, complementadas por testes bioquímicos diferenciais, na sua maioria de produção enzimática, podem gerar resultados com interpretação e classificação mais difícil (MARIN et al, 2006). Entretanto, a possibilidade de uma abordagem molecular permitiu a demarcação de espécies distintas e um avanço nos estudos relacionados a diversidade bacteriana (GEVERS et al, 2005). Entretanto, ironicamente, apesar de promover análises sistemáticas mais robustas, revelou também uma estimativa de que menos de 1% da diversidade bacteriana existente atualmente é conhecida (GIOVANNONI e STINGL, 2005).

Tal estimativa reflete a escassez de trabalhos referentes à identificação de bactérias patógenas em ambientes de cultivo e nos organismos cultivados, embora um relevante avanço possa ser destacado na última década (DEFOIRDT, 2013). No caso dos cavalos-marinhos, podem ser destacados os estudos relativos a *H. guttulatus* (BALCÁZAR et al, 2010), *H. kuda* (TANU et al, 2012) e *H. trimaculatus* (WANG et al, 2016), todos tendo como foco a microbiota intestinal. Apenas Balcázar e colaboradores (2010) analisaram, em

paralelo, amostras da água do cultivo. Nesse contexto, as famílias de bactérias dominantes para essas espécies foram Alcaligenaceae (*H. trimaculatus*), Bacillaceae (*H. kuda*), Enterobacteriaceae (*H. trimaculatus*, *H. kuda*), e Vibrionaceae (*H. kuda*, *H. guttulatus*).

A maioria dos trabalhos publicados vem dando atenção à identificação de patógenos em eventos de infecção com diversos quadros clínicos, nos quais espécies de *Vibrio* estão entre as maiores causadoras de doenças bacterianas, causando altas taxas de mortalidade (ACTIS et al, 1999; KOLDEWEY et al, 2005). Cepas de *V. harveyi* já foram isoladas em diversos quadros infecciosos no cultivo de *H. kuda*; os principais quadros clínicos observados foram hemorragia externa e no fígado e acumulação de líquido na cavidade intestinal (ALCAIDE et al, 2001), fraqueza e movimentação lenta, região abdominal deprimida e em alguns casos rins pálidos (TENDENCIA, 2004), manchas esbranquiçadas ao longo do corpo (THAMPI RAJ et al, 2009) e necrose no tecido da cauda com formação de manchas esbranquiçadas (DECLERCQ et al, 2014). Além de infecções causadas por *Vibrio*, uma infecção mista causada por metazoários e bactérias em bexiga natatória foi relatada para *H. erectus* (ANDERSON et al, 2013), cujos indivíduos apresentaram região superior do tronco dilatada e dificuldade de flutuabilidade; as cepas isoladas foram identificadas como *Gordonia* sp. e *Mycobacterium poriferae*.

Para *Hippocampus reidi*, espécie alvo de exportação no Brasil e espécie foco do presente estudo, os dados são bastante restritos, com apenas um trabalho (MARTINS et al, 2010) relatando a ocorrência de *V. alginolyticus* como patógeno em condições de cultivo, causando alta taxa de mortalidade, necrose no epitélio bucal e alterações no tecido do aparelho branquial.

Assim, levando em conta que o cultivo de *H. reidi* é ainda incipiente e as pressões de captura sob suas populações naturais são altas (DIAS NETO, 2011), e que há um aumento de trabalhos visando estabelecer parâmetros mínimos para o cultivo viável da espécie (e.g. HORA e JOYEUX, 2009; WILLADINO et al, 2012; SOUZA-SANTOS et al, 2013), esse trabalho é voltado para a identificação de gargalos em sistemas de cultivo, avaliando o surgimento de doenças para a espécie.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Caracterizar as principais doenças em cavalos-marinhos da espécie *H. reidi* mantidos em cultivo experimental e descrever eventos de infecções bacterianas.

2.2. Específicos

- ✓ Descrever e quantificar as principais doenças associadas a *H. reidi* em cativeiro, associando os eventos de infecção à qualidade da água;
- ✓ Isolar e identificar espécies de bactérias associadas a lesões cutâneas de *H. reidi* durante eventos de infecção;
- ✓ Isolar e identificar espécies de bactérias presentes na água do cultivo experimental.
- ✓ Sugerir recomendações que possam otimizar o equilíbrio de sistemas de cultivo de *H. reidi*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Sistema de cultivo e animais amostrados

O presente trabalho foi desenvolvido tendo como referência a população estoque para cultivo experimental de cavalos-marinhos da espécie *Hippocampus reidi* do Laboratório de Peixes – Ecologia e Conservação (LAPEC) da Universidade Federal da Paraíba.

No cultivo, os cavalos-marinhos eram mantidos em sistemas de aquários de circulação fechada (SCF) ou em sistemas de aquários isolados (SI) sem filtragem. Toda a água distribuída aos sistemas (SCF e SI) passava antes pelo sistema de distribuição (SD), onde a água do mar é filtrada mecanicamente por malhas de micra e submetidas a constante filtragem ultravioleta com lâmpadas de 90W.

Os SCF consistiam de dois aquários de 450L, cada um conectado a um *sump*, onde ocorria filtragem mecânica (perlon e malha de plâncton), filtragem química (*skimmer* Tunze), biológica (5 kg de biocerâmica – *Ocean Tech, Professional Aquarium*) e ultravioleta (filtro Atman – 36W). Trocas parciais de 10% para retirada de fezes e sobras de alimento eram feitas diariamente nos SCF. Os SI consistiam de aquários de 30 a 80 L, todos mantidos com aeração constante, cujas trocas parciais de água diárias variavam de 50 a 75%. Em todos os sistemas, os animais eram alimentados *ad libitum* duas vezes ao dia (09:00 e 16:00) com pós-larvas de camarão (*Litopenaeus vannamei*) durante trinta minutos.

De acordo com o protocolo mantido no LAPEC, planilhas de acompanhamento das atividades desempenhadas durante a rotina de manutenção da população estoque eram elaboradas diariamente, sendo registrados: parâmetros físico-químicos da água (concentração de nitrito e amônia, temperatura, salinidade, pH), trocas parciais de água em cada SCF/SI, aspectos comportamentais dos animais, taxas de mortalidade e natalidade, bem como eventuais alterações da rotina programada.

3.2. Registro de doenças

A partir do banco de dados gerado de acordo com as planilhas de acompanhamento do LAPEC no período de janeiro de 2011 a julho de 2015, foi feito um levantamento do número de indivíduos doentes e dos tipos de doenças registrados, em relação aos tipos de sistema (SCF ou SI) onde os animais eram mantidos. O registro dos sintomas foi baseado em descrições prévias na literatura (LePage et al., 2015).

Além disso, uma vez que concentrações de compostos nitrogenados, mesmo em pequenas concentrações, podem ser tóxicas para a maioria dos animais mantidos em cultivo (Timmons et al., 2012), podendo causar elevação no nível de cortisol, alterações no aparelho branquial e convulsões (Randall, 2002), as concentrações de amônia e nitrito foram avaliadas em cada sistema de manutenção. Adicionalmente, outros registros que possivelmente seriam causas de eventos de mortalidade, como a troca no fornecedor de alimento (pós-larva de camarão *Litopenaeus vannamei*) no ano de 2012, problemas na filtragem ultravioleta em janeiro de 2013 e infestação de copépodas no ano de 2015, também foram observados. Parâmetros como pH, temperatura, salinidade e fotoperíodo não apresentaram variações importantes ao longo do período avaliado, sendo mantidos em $8,2$, 24 ± 1 °C; 27 ± 1 ppm e 10L:14E, respectivamente, e não foram incluídos nas análises.

3.3. Amostragem de lesões cutâneas nos cavalos-marinhos e da água dos sistemas

Foram coletadas, durante o período de um ano (abril de 2014 a abril de 2015), amostras de lesões cutâneas, por meio de esfregaço com *swab*, em *H. reidi* do cultivo experimental. Nesse período, os sistemas foram monitorados quanto à ocorrência de lesões cutâneas. Após coleta do material, cada indivíduo foi submetido à quarentena em aquários isolados (7L), onde foi observado diariamente e alterações anatômicas e/ou comportamentais foram registradas por observações diretas ou através de fotografias.

Além de indivíduos com lesões cutâneas, foram coletadas amostras de *swab* da cavidade torácica de dois indivíduos com bexiga natatória inflada e com dificuldades de equilíbrio.

Adicionalmente, foram coletadas amostras de 50 ml de água em tubos estéreis dos SCF e do sistema de distribuição de água (SD) durante os eventos de infecção, para posterior análise microbiana da água.

3.4. Isolamento bacteriano

Foi feito esfregaço com *swab* em aproximadamente 1cm² na área lesionada dos indivíduos doentes; para os indivíduos que apresentaram lesões com tamanhos inferiores a 1cm² (n = 4), o esfregaço foi feito em toda a região da lesão. Após a coleta, o *swab* foi submerso e diluído em solução salina 0,85% estéril e diluições seriadas foram realizadas até 3x10⁻², e alíquotas de 0,1 ml da diluição foram semeadas em placas de Petri contendo meio de cultura não seletivo Marine Broth (DifcoTM), acrescido de cicloheximida (0,2 g.L⁻¹), em triplicata. As placas foram incubadas em aerobiose a 30°C por um período de 24 a 72 horas.

Após o período de incubação e crescimento bacteriano, procedeu-se a contagem de unidades Formadoras de Colônias (UFC). Além do número de colônias, também foi determinado o número de morfotipos total para cada placa, os quais foram determinados de acordo com as características da colônia: coloração, formato da borda, tipo de crescimento, tamanho e textura da colônia. O número de UFC foi, então, calculado de acordo com a seguinte fórmula (Buller, 2004):

$$\text{UFC}(\text{mL}^{-1}) = \text{número de colônias} / (\text{diluição da amostra} * \text{vol. inoculado})$$

Para cada amostra (lesão ou água), escolheu-se uma placa mãe com maior variedade de morfotipos para isolamento; um N = 20 de isolados foi estabelecido para cada amostra, levando-se em conta que esse N representasse proporcionalmente a variedade de colônias observadas na placa mãe.

O isolamento foi feito em capela de fluxo laminar e as colônias selecionadas foram purificadas por esgotamentos sob aerobiose em placas de Petri contendo meio Tryptic Soy Broth (TSB - BDTM) acrescido de 1,5% de NaCl. Adicionalmente, para um armazenamento a longo prazo dos isolados, estes foram mantidos em Marine Broth acrescido de glicerol 30% a 0°C. Os isolados foram também inoculados em falcons contendo 10 ml Marine Broth, a 30°C por aproximadamente 48 horas para crescimento e posterior extração de material genético.

3.5. Extração de DNA dos isolados bacterianos

Após crescimento em falcons contendo 10 ml de meio Marine Broth, a extração de DNA dos isolados foi feita seguindo a metodologia adaptada de Moreira e colaboradores (2005). De forma resumida, as células foram inicialmente centrifugadas a 4.000 rpm durante 10 minutos, após essa centrifugação o sedimento foi ressuspensionado com 1 ml de Tampão TE₁₀

(Tris 50 mM, EDTA mM, pH 8.0), acrescido de lisozima (10mg/ml) e incubados por 1 hora sob agitação constante. Após incubação, as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm durante 5 minutos e o sedimento obtido foi ressuspenso em TE₁₀ acrescido de SDS 1%, para lise celular, e de 100µg/ml de RNase. A mistura foi extraída com um volume de clorofane (fenol:clorofórmio:álcool isoamílico na proporção de 25:24:1) sob agitação manual, seguido de centrifugação a 14000 rpm. A fase aquosa da mistura foi transferida para um novo tubo a fim de se proceder com a extração com clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico na proporção de 24:1). Finalmente, o DNA na fase aquosa da extração foi precipitado com um volume de isopropanol absoluto gelado. O material precipitado foi sedimentado por centrifugação a 14.000 rpm durante 10 minutos e o sedimento foi ressuspenso em 100ul de água ultra pura estéril. Ao término da extração, as amostras foram mantidas a 0°C.

Ao término dessa etapa, as amostras foram quantificadas em gel de agarose 1,4% a 100V por 30 minutos em tampão TBE 0,5X a partir da intensidade de coloração exibida por comparação com DNA comercial.

3.6. PCR e sequenciamento

A amplificação do gene rRNA 16S de todos os isolados foi feita utilizando os “primers” pA (5’ – AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG – 3’) e pH (5’ – AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA – 3’) (Thompson et al., 2001). Os “primers” foram sintetizados pela *Integrate DNA Technologies*®. A reação foi realizada em 50 µl de volume final contendo 0,5 µM de cada iniciador, 0,2 µM de cada dNTP, tampão de reação (1x) com 1,5 de mM MgCl₂ e 1 µl de Taq DNA polimerase. A amplificação foi programada para um ciclo de desnaturação de 2 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1,4% a 100V por 1 hora em tampão TBE 0,5X, corados com Syber® (DNA gel stain – *ThermoFisher Scientific*) e fotografados em fotodocumentador com iluminação ultravioleta.

Os produtos de PCR foram purificados com o kit PureLink™ (PCR Purification Kit – *Invitrogen, Life Technologies*) seguindo as instruções do fabricante. O sequenciamento foi realizado na plataforma de sequenciamento de DNA da Universidade Federal de Pernambuco.

3.7. Análise de dados

Os resultados referentes ao registro de doenças nos sistemas encontram-se apresentados na forma de média $\pm$ desvio padrão e foram analisados utilizando o programa STATISTICA 8.0. Todos os dados foram verificados quanto à normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homocedasticidade (teste HOV de Brown-Forsythe), para aplicação adequada de testes paramétricos e não-paramétricos.

Para comparar o número de indivíduos doentes ao longo dos anos, foi feita uma análise de variância (ANOVA), com diferenças significativas entre os anos sendo verificadas através do pós-teste de *Tukey*. Para comparar o número de indivíduos doentes em relação ao tipo de sistema (SCF e SI), foi utilizado teste *t* de Student. O mesmo teste também foi utilizado para avaliar que tipo de sistema apresentou maior variação nos níveis de nitrito; em relação aos níveis de amônia, foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

O teste de Wilcoxon para amostras dependentes foi utilizado para comparar as concentrações de amônia entre os meses que apresentaram registros de indivíduos doentes com os meses sem registros de indivíduos doentes; para as concentrações de nitrito, foi utilizado o teste *t* para amostras dependentes.

Em relação às análises genéticas, as sequências resultantes do sequenciamento de DNA foram analisados usando as ferramentas Pregap4 e Gap4 do pacote de softwares STADEN 1.6 e submetidos à busca de similaridade no banco de dados NCBI, utilizando a ferramenta Blast N (Altschul *et al.*, 1997) e adicionalmente no banco de dados RDP (*Ribosomal Database Project – Michigan State University, USA*). A identificação bacteriana foi assumida se a sequência de consulta mostrar $\geq 97\%$ para o gene 16S (Gevers *et al.*, 2005).

Para as sequências que não apresentaram os níveis de similaridade assumidos acima, foram feitas análises filogenéticas com as sequências das linhagens tipo disponíveis no NCBI. O alinhamento múltiplo dessas sequências foi realizado a partir do programa CLUSTALw (Thompson *et al.*, 1994) e visualizado através do programa MEGA 7 (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*). Os agrupamentos baseados nas inferências filogenéticas foram construídos aplicando o *Neighbour-Joining* (Saitou e Nei, 1987) com testes estatísticos *bootstrap* com 1000 replicações.

4. RESULTADOS

4.1. Registro de doenças, mortalidade e qualidade da água nos sistemas de manutenção

Durante o período analisado, foram registrados 192 cavalos-marinhos doentes no cultivo experimental. Dentre as doenças observadas (**Figura 1**), dermatites foram as mais frequentes, representando 46,3% dos casos, o que inclui lesões ulcerativas, manchas esbranquiçadas ao longo do corpo e descamação de tecido; 28,6% dos registros foram de casos de morte súbita sem sinais premonitórios (MS); indivíduos com doença das bolhas (DB) “*gás bubble disease*” corresponderam a 18,2% dos registros e 6,7% dos casos foram de indivíduos com dificuldades de equilíbrio (DE) e natação. Abaixo, segue a descrição das doenças registradas:

○ **Dermatites:**

Dermatites em geral se caracterizaram como quadros clínicos severos, estando associadas à perda de apetite e causando mortalidade em todos os casos. Quatro tipos de dermatites foram observados: lesão no ápice da cauda (17,9%) (**Figura 1 – C e D**), com crescimento distal, desprendimento de tecido e, em alguns casos, exposição da coluna vertebral; lesão com crescimento irregular na bolsa incubadora (7,8%); lesões ulcerativas ao longo do corpo (43,8%); manchas esbranquiçadas (20,2%) (**Figura 1 – A e B**); e desprendimento de tecido ao longo do corpo (12,3%).

○ **Doença das bolhas e dificuldades de equilíbrio:**

A “doença das bolhas” foi caracterizada pela presença de ar dentro da bolsa incubadora de indivíduos machos. Os animais apresentaram problemas de flutuabilidade e orientação no aquário. Apesar de nadarem na posição vertical (orientação comum para cavalos-marinhos), os indivíduos apresentavam-se constantemente de cabeça para baixo com a cauda e bolsa na superfície da água. Apesar de alterar drasticamente o comportamento dos indivíduos, foi caracterizada como um quadro clínico intermediário, tendo em vista que após a retirada do ar, por meio de massagem manual na bolsa e a administração de 1/8 de Diamox por 3 dias - medicamento este comumente usado na aquicultura para o tratamento da doença das bolhas (Koldewey et al, 2005), os indivíduos se recuperaram e não houve registros de óbito. Tal quadro foi recorrente em alguns indivíduos.

Indivíduos com dificuldades de equilíbrio também se mantiveram na superfície do aquário, porém, nesses casos, a região do tronco era a área de contato com a superfície da água. Nesse quadro clínico, três indivíduos apresentaram a região do tronco dilatada (**Figura 1 – E, F e G**), constatando-se, após biópsia, que os indivíduos apresentavam a bexiga natatória dilatada na cavidade torácica. Amostras de *swab* coletadas de dois dos indivíduos não apresentaram crescimento bacteriano.

○ **Morte súbita (MS):**

Indivíduos incluídos nessa categoria foram encontrados mortos e não apresentaram quaisquer alterações anatômicas e/ou comportamentais que indicassem sintomas de doença ou causa de morte, sendo comumente observado no intervalo de um dia para o outro.

Figura 1: Número de registros das principais doenças apresentadas por cavalos-marinhos da espécie *Hippocampus reidi* ao longo de cinco anos no cultivo experimental do Laboratório de Peixes – Ecologia e Conservação (LAPEC) – Universidade Federal da Paraíba. DB: doença das bolhas, DE: dificuldades de equilíbrio, MS: morte súbita sem sinais premonitórios.

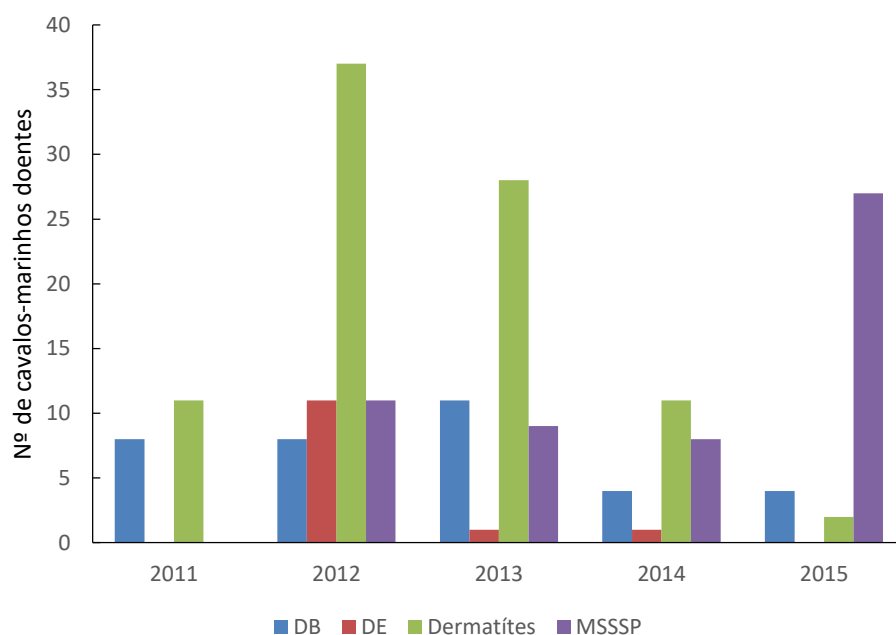
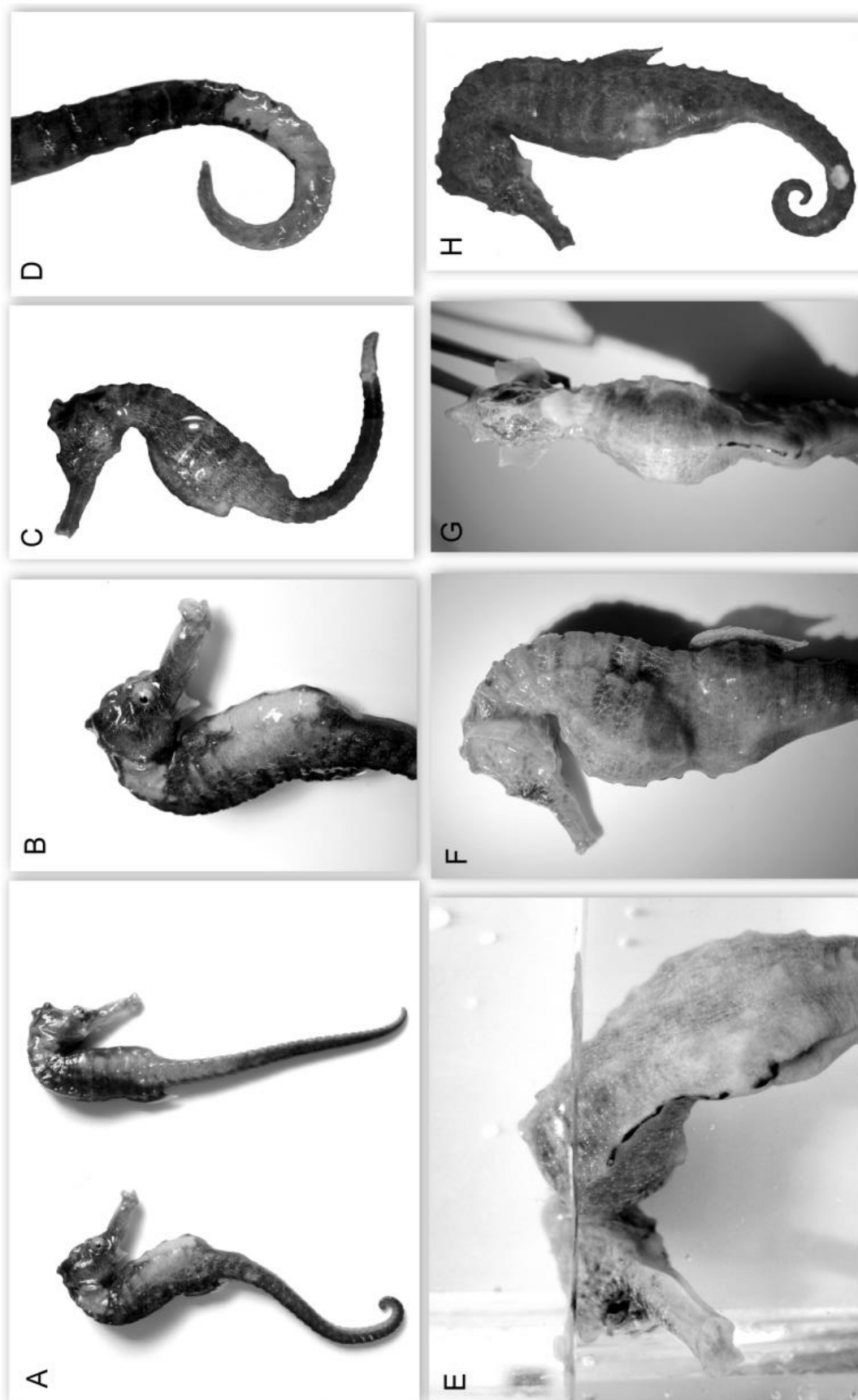


Figura 2: Exemplos de cavalos-marinhos doentes da espécie *Hippocampus reidi* mantidos em cultivo experimental do Laboratório de Peixes – Ecologia e Conservação (LAPEC) – Universidade Federal da Paraíba. A, B, C, D e H – Exemplos de dermatites; F e G – Indivíduo com dificuldades de equilíbrio e bexiga natatória inflada.

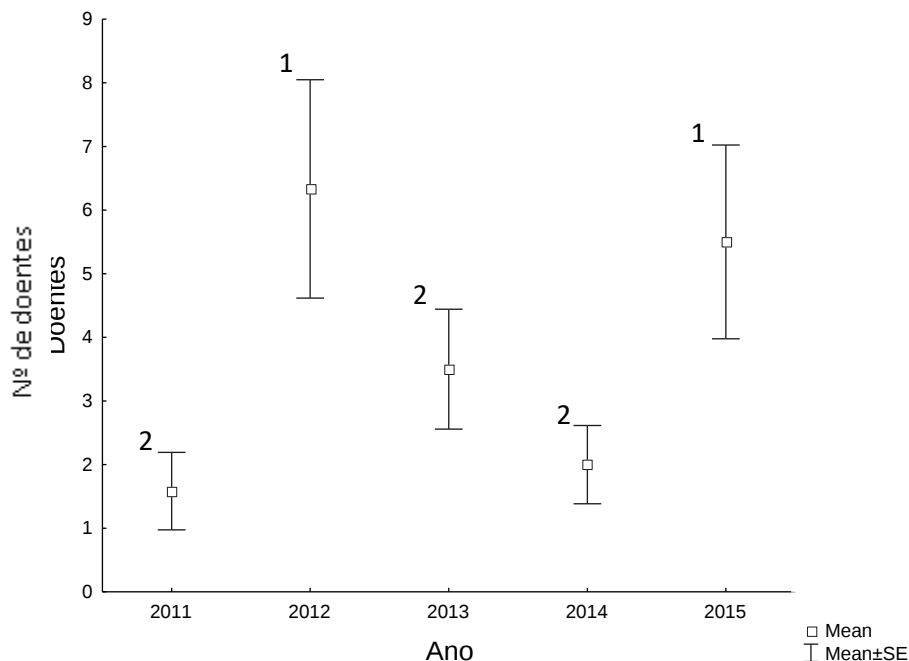


Os anos de 2012 e 2015 apresentaram os maiores picos de registros de animais doentes ($F_{4;49} = 3.470$, $p = 0,01$; *post hoc* Tukey, $p < 0,05$), apresentando também as maiores taxas de mortalidade em 2015 ($F_{4;49} = 3.316$, $p = 0,02$; *post hoc* Tukey, $p < 0,05$) (**Tabela 1; Figura 3**). Nos anos subsequentes (2013 e 2014), a porcentagem de animais doentes ao longo do ano foi aproximada, com 58% no SCF e 47% no SI para o ano de 2013 e 26% no SCF e 23% no SI para o ano de 2014.

Tabela 1: Média do número de indivíduos por aquário (Ind./aq.), de litros de água por animal (animal/L) e percentual de mortalidade de indivíduos (28,7%) da espécie de cavalo-marinho *Hippocampus reidi* mantidos em cultivo experimental no Laboratório de Peixes – Ecologia e Conservação (UFPB), ao longo de cinco anos de cultivo. Fatores adversos não controlados no cultivo também são apresentados como troca no fornecedor de alimento em março, diminuição na oferta de pós-larva em consequência da troca de fornecedor (julho à novembro), introdução de *Artemia salina* e filtragem ultravioleta do SD desativado durante o mês de janeiro para ambos os sistemas (SCF e SI) e infestação de copépodos no SCF. ^ Significa valor total, não representa média.

	Ind.	Animal/L	Maior registro de doentes	N de mortos	% mort.	Fatores não controlados no cultivo
2011						
SCF1	63	1 / 7	Agosto	8	12,6	
SCF2	57	1 / 7,8		3	5,2	
SI	7	1 / 7,3		3	3	
	42,3	1 / 7,3			6,9	
2012						
SCF1	55	1 / 8	Maio	31	56,3	*Troca no fornecedor de alimento (pós-larva de camarão <i>Litopenaeus vannamei</i>) em março: diminuição na oferta de pós-larva (julho à novembro) e introdução de <i>Artemia salina</i> *Infestação de copépodos nos SCF em maio
SCF2	48	1 / 9		23	47,9	
SI1	59	1 / 1		1	1,6	
SI2	12	1 / 3		3	25	
	43,5	1 / 5,2			32,7	
2013						
SCF1	56	1 / 8	Março	28	50	Filtragem ultravioleta do sistema de tratamento e distribuição de água para os aquários desativado durante o mês de janeiro. Lâmpadas UV em falta no mercado.
SCF2	25	1 / 18		3	12	
SI1	17	1 / 4		2	11,7	
	32,6	1 / 10			24,5	
2014						
SCF1	36	1 / 12	Setembro	9	25	
SCF2	31	1 / 14		9	29	
SI1	19	1 / 3		7	36	
SI2	15	1 / 4		1	6	
	25	1 / 8,25		6	24,0	
2015						
SCF1	29	1 / 15	Fevereiro	17	58	Infestação de copépodos nos SCF em janeiro
SCF2	28	1 / 16		12	42	
	28,5	1 / 15,5		14,5	50,7	
total	^557	1 / 9,2±3,8		^159	^28,7%	

Figura 3: Média dos registros de indivíduos doentes de cavalos-marinhos da espécie *Hippocampus reidi* ao longo de cinco anos, no cultivo experimental do Laboratório de Peixes – Ecologia e Conservação (LAPEC) – Universidade Federal da Paraíba. $F_{4;49} = 3.470$, $p = 0,01$; *post hoc* Tukey, $p < 0,05$: grupos demonstrados através da numeração sobre as barras.



Quanto ao número de indivíduos doentes nos diferentes sistemas de aquários, a média nos SCF foi significativamente superior à de indivíduos mantidos nos SI ($t = 3.602$, g.l. = 106, $p < 0,01$; **Figura 4**). Entretanto, quando comparada a variação das concentrações de compostos nitrogenados ao longo dos anos, os SCF apresentaram valores menores em relação aos SI, tanto para as concentrações de amônia ($U = 139.000$, g.l. = 100, $p < 0,01$) quanto de nitrito ($t = -5.574$, g.l. = 94, $p < 0,01$; **Figura 5**).

Em relação à concentração de compostos nitrogenados, foi observada uma maior concentração de amônia tanto no SCF ($T = 0.00$, g.l. = 8, $p < 0,01$) quanto no SI ($T = 0.00$, g.l. = 5, $p < 0,03$) e de nitrito ($t = 4.538$, g.l. = 6, $p < 0,01$ e $t = 7.480$, g.l. = 7, $p < 0,01$, respectivamente) durante os períodos em que foram registrados animais doentes, em relação aos períodos em que não houve registro de doenças (**Figura 6**). Este resultado pode ser observado também ao longo dos anos, cujos maiores registros de animais doentes coincidem com os maiores picos de amônia e nitrito (**Figura 7 e 8**).

Figura 4: Média de indivíduos doentes de cavalos-marinhos da espécie *Hippocampus reidi* mantidos em aquários com Sistemas de Circulação Fechada (SCF) e Sistemas Isolados sem circulação (SI), no cultivo experimental do Laboratório de Peixes – Ecologia e Conservação (LAPEC) – Universidade Federal da Paraíba. $t = 3.602$, g.l. = 106, $p < 0,01$.

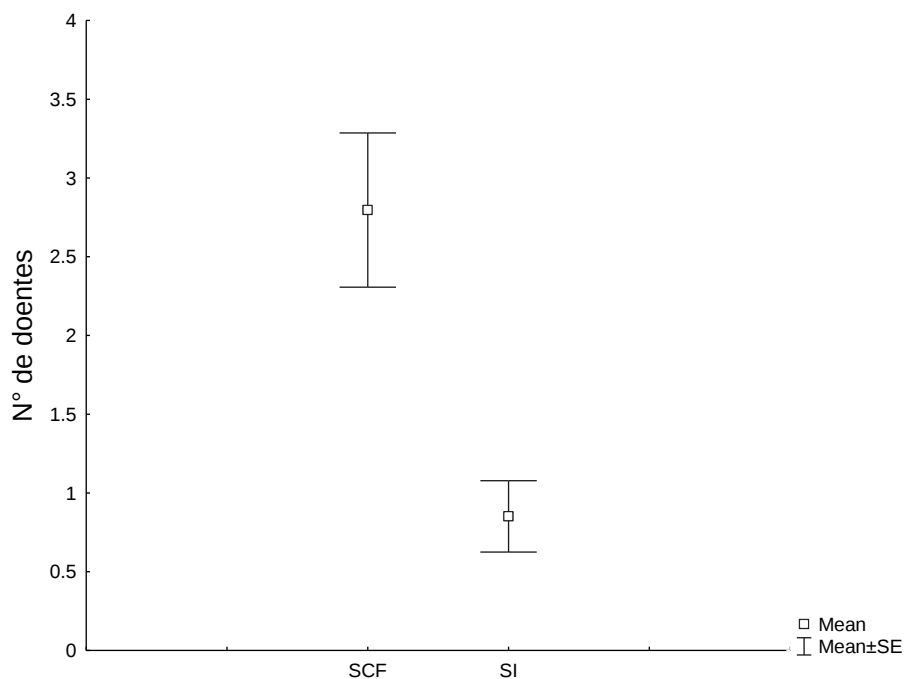


Figura 5: Média da variação de compostos nitrogenados, Nitrito (ppm) (A) e Amônia (ppm) (B), em sistemas de aquários com Sistemas de Circulação Fecha (SCF) e Sistemas Isolados sem circulação (SI), no cultivo experimental de cavalos-marinhos da espécie *Hippocampus reidi* no Laboratório de Peixes – Ecologia e Conservação (LAPEC) – Universidade Federal da Paraíba. (Nitrito, $t = -5.574$, g.l. = 94, $p < 0,01$; Amônia, $U = 139.000$, g.l. = 100, $p < 0,01$).

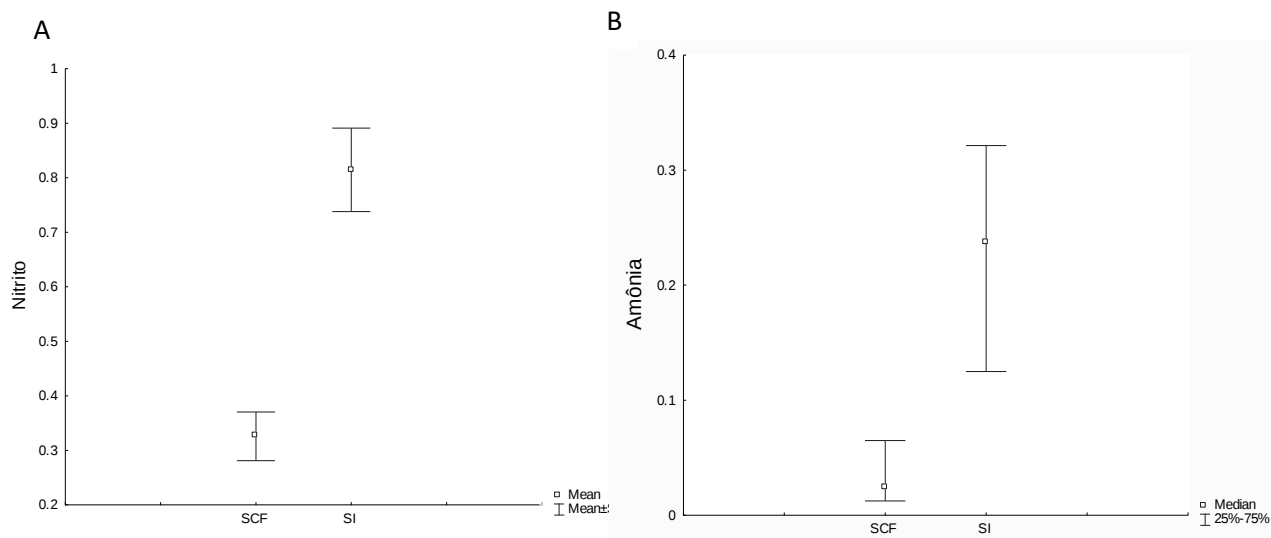


Figura 6: Média da variação de amônia (ppm) em aquários com Sistemas de Circulação Fechada (SCF) (A) e Sistemas Isolados sem circulação (SI) (B) entre períodos com indivíduos doentes (SCF/com e SI/com) e sem indivíduos doentes (SCF/sem e SI/sem) de cavalos-marinhos da espécie *Hippocampus reidi*, no Laboratório de Peixes – Ecologia e Conservação (LAPEC) – Universidade Federal da Paraíba. (Wilcoxon. SCF, $T = 0.00$, g.l. = 8, $p < 0.00$; SI, $T = 0.00$, g.l. = 5, $p < 0.03$).

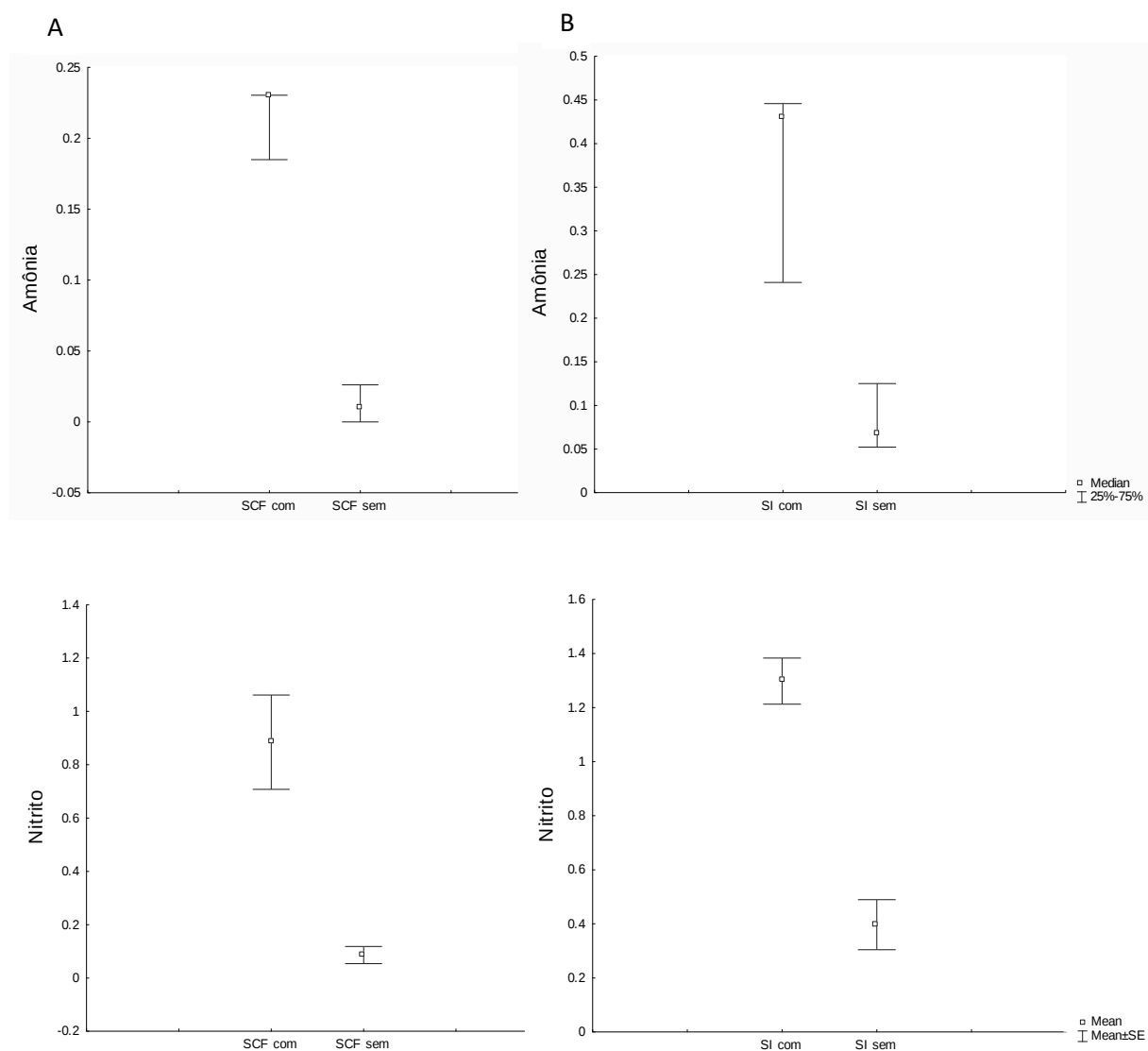


Figura 7: Registros de indivíduos da espécie de cavalo-marinho *Hippocampus reidi* doentes, mantidos em cultivo experimental no Laboratório de Peixes – Ecologia e Conservação (UFPB) ao longo dos meses dos anos de 2011 a 2015 e médias dos valores de nitrito e amônia dissolvidos nos sistemas de circulação fechado (SCF). Eixo esquerdo: Número de indivíduos doentes. Eixo direito: Concentração de nitrito e amônia.

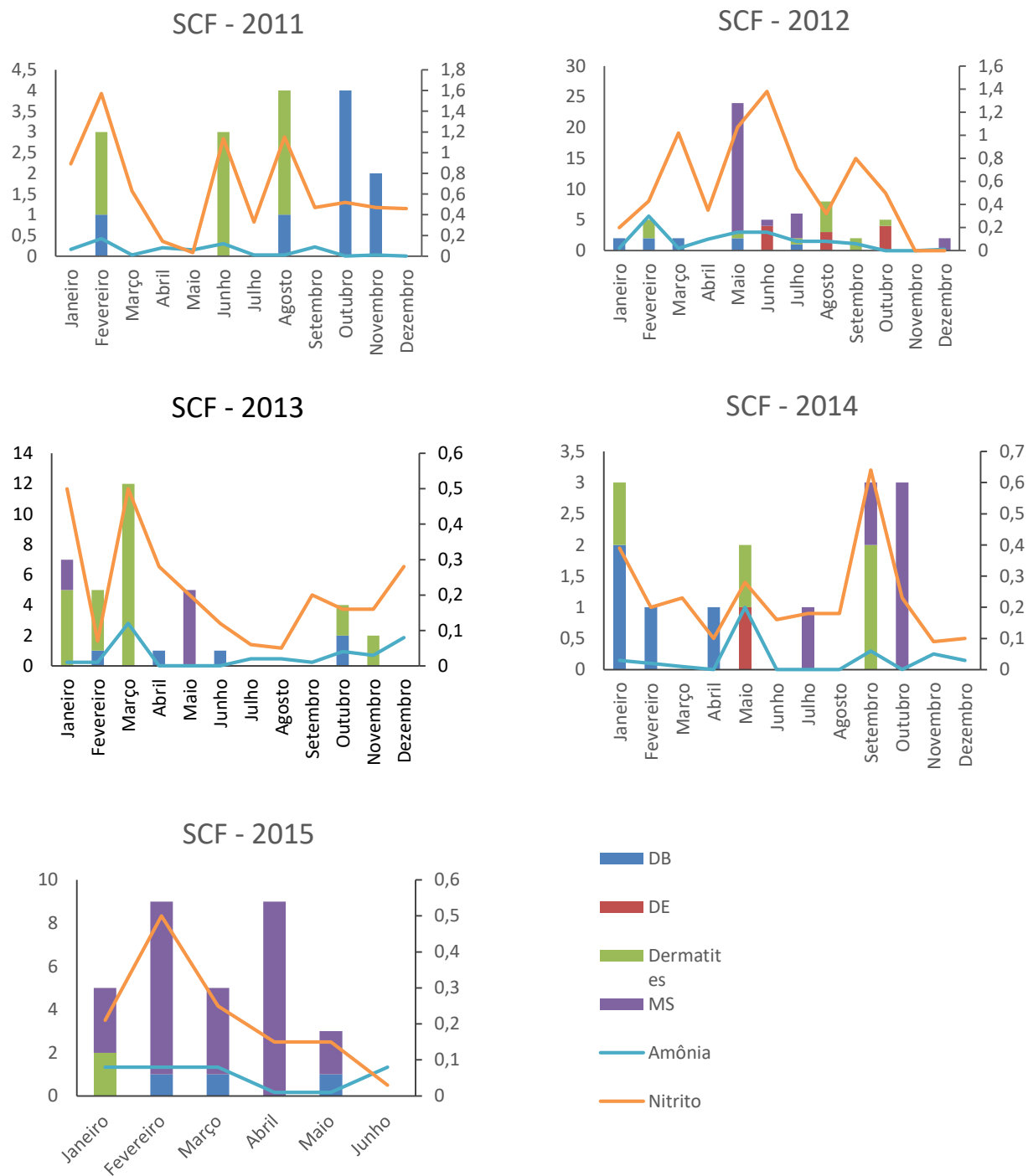


Figura 8: Registros de indivíduos da espécie de cavalo-marinho *Hippocampus reidi* doentes, mantidos em cultivo experimental no Laboratório de Peixes – Ecologia e Conservação (UFPB) ao longo dos meses dos anos de 2011 a 2015 e médias dos valores de nitrito e amônia dissolvidos nos sistemas de aquários isolados sem filtragem (SI). Eixo esquerdo: Número de indivíduos doentes. Eixo direito: Concentração de nitrito e amônia.



4.2. Descrição dos eventos de infecção e sintomas

Três eventos de infecção cutânea em seis indivíduos de *H. reidi* (todos provenientes do SCF) foram registrados durante abril / 2014 e abril / 2015, sendo três tipos de lesão identificados: lesão na cauda tipo I e tipo II e lesão na bolsa incubadora, sendo o número de unidades formadoras de colônia proporcional ao tamanho da lesão (**Tabela 2**).

Tabela 2: Eventos de infecção cutânea em indivíduos adultos da espécie *Hippocampus reidi* em condições de cultivo experimental, mantidos em SCF. Características das lesões, características abióticas e unidades formadoras de colônia (UFC) por centímetro quadrado da lesão. (Ind.: Indivíduo; M – Macho, F – Fêmea; Temp.: Temperatura; Sal.: Salinidade).

Ind.	Sexo	Altura (cm)	Período	Concentração de amônia/nitrito	Temp. da água (°C)	Sal. (ppm)	Tipo da lesão	Tamanho da lesão (cm)	UFC/cm ²
1	F	14	Mai/2014	0,1/0,25	26	28	Cauda I	0,2	0
2	F	11	Ago/2014	0,1/0,25	26	28	Cauda I	0,3	0
3	F	14	Set/2014	0,0/0,5	25,5	28	Cauda I	1,2	59x10 ⁻²
4	M	13,2	Jan/2015	0,25/0,5	25,5	27	Cauda II	0,5	14x10 ⁻²
5	M	14,3	Set/2014	0,15/0,5	25	27	Bolsa	1,3	163x10 ⁻²
6	M	13	Jan/2015	0,1/0,5	25	27	Bolsa	0,4	57x10 ⁻²

A seguir, encontram-se detalhadas as características das lesões e o quadro clínico apresentado pelos cavalos-marinhos:

○ Lesão na Cauda tipo I

Três fêmeas (altura média: 13 cm) apresentaram lesão do tipo I na cauda. Em todos os casos, a lesão teve início apresentando uma coloração esbranquiçada na extremidade da cauda e posterior crescimento com desprendimento de tecido cutâneo e, em um dos casos, com exposição da coluna vertebral e perda de parte da cauda correspondente ao tamanho da região lesionada (**Figura 9**). O tamanho observado para este tipo de lesão foi de 0,3 a 2,6 cm. Além da lesão, os indivíduos apresentaram dificuldade de natação, contração da cauda e espasmos como indícios de dores sempre que a cauda entrava em contato com a parede do aquário ou quando o indivíduo tentava se prender a algum substrato de apoio disponível. Os indivíduos apresentaram, ainda, perda de apetite durante o período que passaram em quarentena e 100% vieram a óbito entre o período mínimo de 2 e máximo de 5 dias após observada a lesão e início do período de quarentena e tratamento.

Figura 9: Cauda de exemplares de cavalo-marinho da espécie *Hippocampus reidi* pertencentes a população para cultivo experimental do Laboratório de Peixes – Ecologia e Conservação (LAPEC – UFPB) demonstrando a evolução de uma lesão descamativa em um dos indivíduos afetados, com crescimento e perda de parte da cauda, da esquerda para direita (Lesão na cauda tipo I).



○ Lesão na Cauda tipo II

A lesão na cauda tipo II caracterizou-se como uma lesão ulcerativa circular superficial localizada na região lateral esquerda da cauda de um cavalo-marinho macho (13,2 cm). O indivíduo com lesão apresentou perda de apetite e veio a óbito em menos de 24 horas, após submetido a quarentena. O tamanho observado da lesão foi equivalente a 0,5cm (**Figura 10**) e apresentou uma média equivalente a 14×10^{-2} UFC/cm². As amostras da água do aquário e da água do sistema de tratamento e distribuição de água para os aquários apresentaram concentrações equivalentes a 8×10^{-2} e 4×10^{-2} UFC/cm², respectivamente.

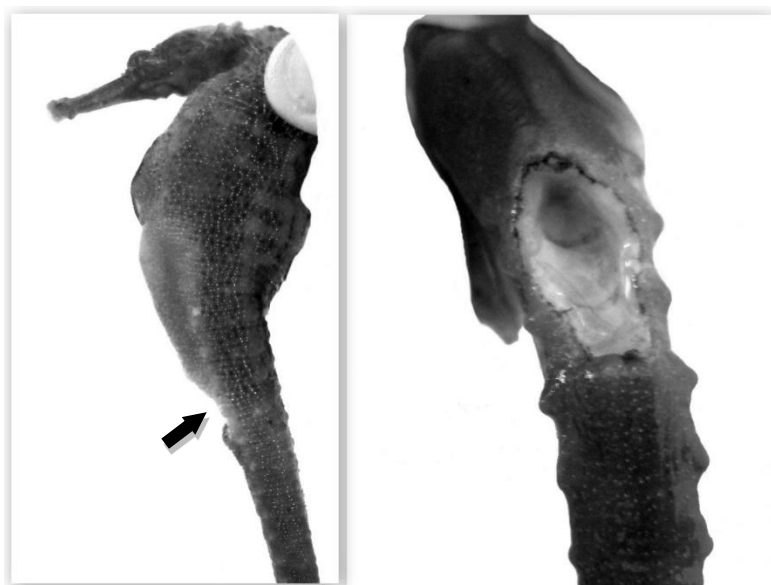
Figura 10: Cauda de exemplar de cavalo-marinho da espécie *Hippocampus reidi* pertencentes à população para cultivo experimental do Laboratório de Peixes – Ecologia e Conservação (LAPEC – UFPB) com lesão ulcerativa superficial (Lesão na cauda tipo II).



○ Lesão na Bolsa incubadora

Dois indivíduos machos (altura média: 13,6 cm) apresentaram lesão ulcerativa profunda na bolsa incubadora: no indivíduo 1, observou-se uma lesão aparentemente em estágio inicial de desenvolvimento com um diâmetro equivalente a 0,3 cm; já o indivíduo 2 apresentou uma lesão mais profunda, em estágio avançado de deterioração do tecido da bolsa incubadora (**Figura 11**).

Figura 11: Vista lateral (esquerda) e ventral (direita) de exemplar macho de cavalo-marinho da espécie *Hippocampus reidi* com lesão ulcerativa na bolsa incubadora, pertencente à população para cultivo experimental do Laboratório de Peixes – Ecologia e Conservação (LAPEC – UFPB).



4.3. Patógenos associados às lesões e amostras de água

Um total de 119 isolados bacterianos foi cultivado e identificado através do sequenciamento do gene rRNA 16S. Destes, 67 foram cultivados a partir de três tipos de lesões ulcerativas, 48 isolados da água do aquário em eventos de infecção e 4 isolados do sistema de distribuição de água tratada que abastece os sistemas do cultivo. Dentre os isolados, foram identificadas um total de 12 espécies bacterianas distintas (**Figura 12**), distribuídas em 7 famílias, cujas famílias mais abundantes em lesões cutâneas foram Micrococcaceae (38,2%), Vibrionaceae (25,5%) e Bacillaceae (23,4%) e em isolados da água Pseudoalteromonadaceae (51,4%) e Bacillaceae (34,2%).

Dos representantes identificados na lesão na cauda tipo I, duas famílias foram classificadas, dentre as quais *Micrococcaceae* foi a dominante, representada por duas

espécies (*Micrococcus luteus* e *Kocuria palustris*), dos quais 94,44% de isolados pertenceram a espécie *Kocuria palustris*. Nenhuma das espécies isoladas desse tipo de lesão ocorreu em outros tipos de lesão.

Na lesão na cauda tipo II e na amostra da água do aquário nesse evento de infecção foram identificadas duas espécies, *Roseovarius crassostreae* e *Bacillus cereus*. *Bacillus cereus* foi também isolada na amostra de água do sistema de tratamento e distribuição de água nesse período, bem como em amostra de outros tipos de lesão (lesão na bolsa incubadora) e nas amostras de água do aquário coletadas durante o período de coleta de indivíduos com lesão na bolsa incubadora.

Em relação às cepas isoladas nos indivíduos com lesão na bolsa, o indivíduo 1, com lesão pequena (0,3 cm) apresentou uma maior diversidade de espécies. Foram identificadas quatro famílias (*Vibrionaceae*, *Bacillaceae*, *Staphylococcaceae* e *Pseudomonadaceae*), dentre as quais *Vibrionaceae* foi a família dominante, representada pelas espécies *Vibrio harveyi* e *Vibrio owensii*. Cepas de *Staphylococcus saprophyticus* também foram isolados desses indivíduos, porém em menor densidade (15 % dos isolados). Não foram encontradas cepas de *S. saprophyticus* na água para o indivíduo 1.

O indivíduo com lesão na bolsa incubadora em estágio avançado (1,3 cm) apresentou apenas cepas identificadas como *Bacillus cereus* (60%) e *Staphylococcus saprophyticus* (40%), esta última também presente na água do aquário.

Algumas cepas isoladas da lesão na bolsa incubadora (indivíduo 1) e da água do aquário do mesmo indivíduo, foram identificadas apenas em nível de gênero, *Donghicola sp.* e *Bacillus sp.* As mesmas serão identificadas posteriormente com utilização de outros marcadores moleculares.

Figura 12: Espécies de bactérias identificadas em três tipos de lesões (lesão na cauda tipo I e II e lesão na bolsa incubadora) de cavalos marinhos mantidos em SCF em cultivo experimental no Laboratório de Peixes – Ecologia e Conservação (LAPEC) da Universidade Federal da Paraíba.

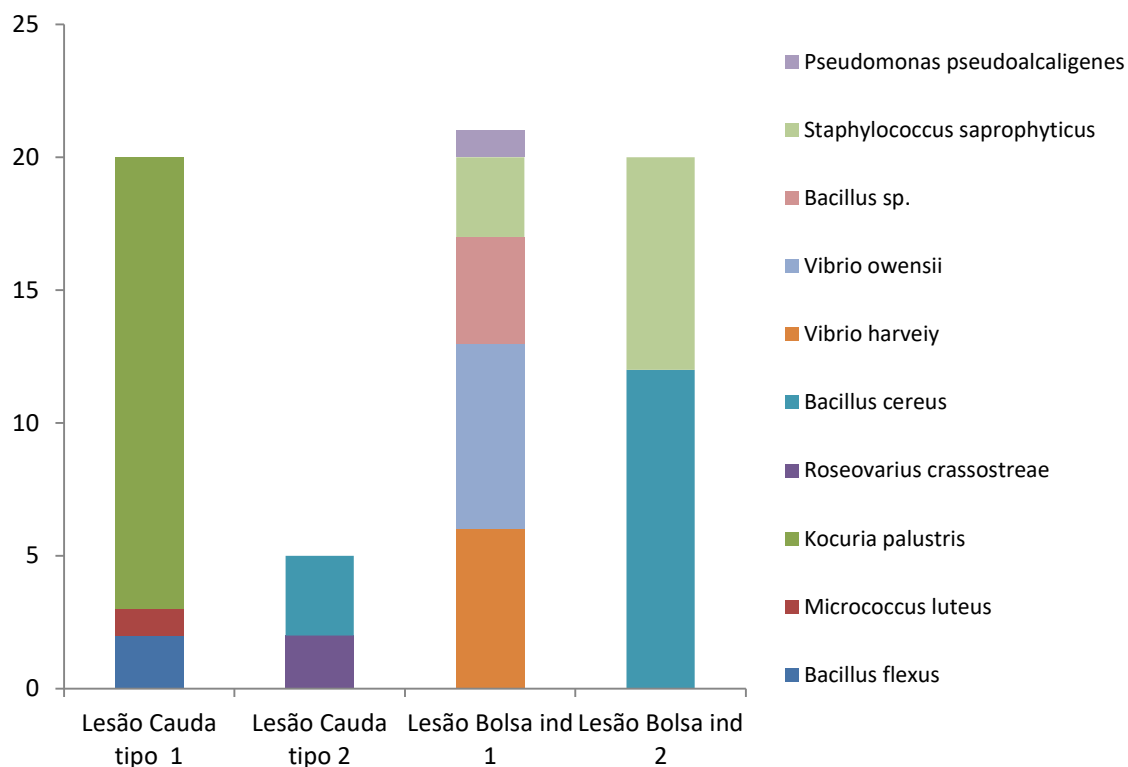
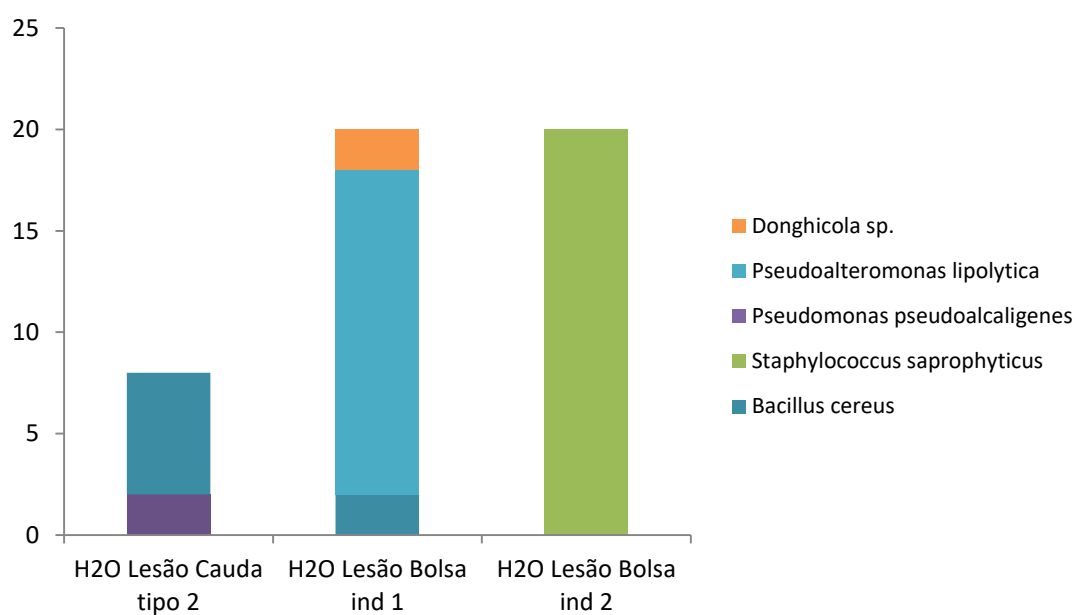


Figura 13: Espécies de bactérias identificadas provenientes da água de SCF durante eventos de infecção em dois tipos de lesões (lesão na cauda tipo II e lesão na bolsa incubadora) de cavalos marinhos mantidos em SCF em cultivo experimental no Laboratório de Peixes – Ecologia e Conservação (LAPEC) da Universidade Federal da Paraíba.



5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo são essenciais para o estabelecimento de protocolos de cultivo exequíveis para *H. reidi* no Brasil. Compreender as possíveis doenças e suas causas, bem como a dinâmica dos sistemas de manutenção, pode evitar problemas que geram taxas de mortalidade expressivas no cultivo.

Na maioria dos sistemas de recirculação de água, a amônia (NH_3) é removida por nitrificação, a sujeira é removida por sedimentação ou filtragem mecânica ou, todo processo é substituído pela troca total da água (van Rijn, 1996). Os dois primeiros passos caracterizam o SCF e o terceiro, caracteriza o SI, cuja única forma de manutenção da estabilidade da água é sua troca semi ou total. O SCF apresentou uma maior estabilidade da qualidade da água, mantendo ambos, amônia e nitrito, em níveis baixos para a espécie (0 mg/l e 0.1 mg/l, respectivamente) (KOLDEWEY e MARTIN-SMITH, 2010) a maior parte do tempo, contrário ao ocorrido no SI. Uma vez que se sabe que a ingestão de toxinas, confinamento e manuseio desses animais provocam respostas de estresse (LUMBERTDACHA et al., 1995; GRUTTER e PANKURST, 2000). A maior estabilidade da qualidade da água no SCF associado a um menor contato com os animais pode acarretar na diminuição dos efeitos nocivos associados ao estresse como alterações no crescimento, condição de resistência total à doença, o escopo para a atividade metabólica, comportamento, e em última análise, a sobrevivência, resumidamente, aspectos do desempenho zootécnico e sanitário (WEDEMEYER e MCLEAY, 1981; WEDEMEYER et al., 1990).

Contrariamente ao que se espera, o número de animais doentes foi significativamente maior no SCF que no SI e, isto pode ter ocorrido por fatores não controlados (Tabela 1). No ano de 2012 ocorreu a maior diferença entre o total de animais doentes do SCF e o SI (55% e 22% da quantidade total de animais), o que coincide com o ano em que houve infestação de copépodos no SCF que, sabidamente, causam um aumento no número de doenças no cultivo de outros peixes marinhos (JOHNSON et al, 2004), seguido da troca do tipo de alimento ofertado (pós-larva de camarão *Litopenaeus vannamei*). Tendo em vista que nos anos subsequentes (2013 e 2014), a porcentagem de animais doentes ao longo do ano foi aproximada, reafirmamos que o surgimento de doenças está mais associado ao aumento súbito da concentração de amônia e nitrito em períodos específicos do que em variações menores ao longo do ano.

Nesse contexto, sistemas de circulação fechada claramente vêm sendo caracterizados como essenciais e mais sustentáveis para a produção em cativeiro, diminuindo as pressões na captura de populações naturais (Wittenrich, 2007), especialmente no que diz respeito à diminuição das variações de compostos orgânicos nos sistemas de manutenção em cativeiro. Entretanto, ainda existem inúmeros fatores críticos, únicos nas diversas espécies de peixes, os quais se apresentam como limitantes à manutenção dos organismos e tornam o cultivo de peixes ornamentais marinhos ainda problemático (Olivoto et al., 2011), resultando no surgimento de doenças e de patógenos oportunistas, aliados a problemas não controlados.

A maioria dos patógenos identificados nas lesões parece ser oportunista, causando, em alguns casos, infecções secundárias nos indivíduos, e bactérias já descritas na literatura como de alta virulência (e.g. *Vibrio*, Koldewey et al., 2005) e causadoras de doenças específicas em organismos marinhos, o que sugere que alterações no ambiente e/ou no indivíduo criam ótimas condições para a formação desses quadros clínicos, conforme já demonstrado na literatura (Oliva-Teles, 2012).

As três espécies isoladas na lesão na cauda tipo I, *B. flexus*, *M. luteus* e *K. palustris* já foram descritas anteriormente em ambiente marinho (Trivedi et al., 2011; Moriguchi et al., 1994; Palomo et al., 2013), podendo ter sido introduzidas no cultivo no período de problemas na filtragem UV do SD ou através do alimento ofertado. Até o momento não haviam sido descritas em associação a quadros clínicos de patogenia, entretanto, *Kocuria palustris*, espécie dominante nesse tipo de lesão, é membro da família *Micrococcaceae* e do gênero *Kocuria*, que inclui 17 espécies de bactérias descritas (Savini et al., 2010) e que são comumente descritas na literatura como causadoras de infecção em pacientes humanos com sistema imune comprometido (Ma et al., 2005; Becker et al., 2008; Tsai et al., 2010; Lai et al., 2011; Moissenet et al., 2012; Purty et al., 2013).

Infecções causadas por espécies de *Kocuria* são consideradas incomuns, entretanto, várias publicações vêm caracterizando-as como potenciais patógenos oportunistas (Savini et al., 2010), causando quadros clínicos que envolvem infecções cutâneas em cateteres venosos, peritonites, desordens metabólicas, colecistite e abscesso cerebral (Dunn et al., 2011; Blecker et al., 2008; Tsai et al., 2010) em hospedeiros comprometidos. Algumas espécies identificadas, por outro lado, já foram amplamente descritas em associação a quadros clínicos em ambientes de cultivo marinho. *Roseovarius*

crassostreae, por exemplo, é considerada agente etiológico da doença que causa lesões em ostras jovens da espécie *Crassostrea virginica*, sendo considerada bactéria de alta virulência para espécimes mantidos em cultivo (Maloy et al., 2007), esse é, portanto, o primeiro registro da espécie em associação a quadros clínicos em outros organismos.

A ampla presença de *B. cereus* em amostras da água, em lesões em estado avançado, bem como em diferentes tipos de lesão, permite sugerir que esta seja também considerada nesses casos como um patógeno oportunista que causa infecções secundárias nas lesões. *B. cereus* é uma espécie de bactéria Gram-positiva, formadora de esporos, aeróbica facultativa que pode ser isolada em uma grande variedade de locais (Pirttijavi et al, 1999; Larsen e Jorgensen, 1999; Rusul e Yacoob, 1995). Assim como outras espécies do gênero, *B. cereus* é comumente encontrada como componente da microbiota do solo devido ao fato de não necessitar de nutrientes complexos bem como sua capacidade de esporulação proporcionar uma maior dispersão ao longo de diversos ambientes (Priest, 1989). Assim, podemos inferir que sua presença no cultivo como resultado de infecção por meio de fatores externos, como contaminação da água, por exemplo.

Embora *B. cereus* tenha sido considerada por muito tempo uma espécie não patogênica ou patogênica oportunista, vem sendo comumente isolada em diferentes contextos infecciosos, principalmente em humanos (Drobniewski, 1993; Turnbull e Kramer, 1983; Kemmerly e Pankey, 1993; Sato et al., 1998). Nagai et al (2003) já haviam isolado essa espécie em ambiente marinho, embora em um contexto de não-infecção, em que caracterizaram a produção de antibióticos de cepas isoladas de esponjas marinhas da espécie de esponja *Halichondria japonica*. Este trabalho é, portanto, o primeiro registro da espécie associada a um evento de infecção em espécies marinhas.

A grande maioria dos registros de infecção por *B. cereus* são de infecções intestinais (Doyle, 1989), entretanto, infecções sistêmicas e locais vêm sendo relatadas, especialmente em pacientes com sistema imunológico comprometido, neonatos, com histórico de uso de drogas, pacientes com lesões traumáticas, cirúrgicas ou causadas por cetéteres (Kemmerly e Pankey, 1993; Drobniewski, 1993;). As infecções traumáticas estão associadas à produção de um fator de permeabilidade vascular dermonecrotica, que pode gerar lesões suaves, mas também infecções profundas com necrose do tecido e purulência (Turnbull e Kramer, 1983; Kemmerly e Pankey, 1993). Embora bastante comum em humanos e bovinos, esse tipo de lesão e infecção ainda não havia sido

registrada em animais não mamíferos, portanto, a presença de *B. cereus* em lesão ulcerativas em cavalos-marinhos, notadamente em uma espécie amplamente comercializada entre diferentes países é certamente um aspecto que merece atenção.

B. cereus produz toxinas que, supostamente, são fatores importantes para a sua patogenicidade (Beecher et al., 1995; Agata et al., 1995; Lund e Granum, 1996), além disso, algumas cepas que apresentam proteínas de superfície celular cristalinas (S-layer) foram capazes de gerar um aumento a resistência a radiação gama (Kotiranta et al., 1999). A resistência a radiação ultravioleta ainda não foi testada para a espécie, entretanto, o crescimento de colônias na água submetida a filtragem UV pode inferir uma possível resistência.

Assim como *B. cereus*, *S. saprophyticus* foi abundante em amostras de água sendo encontrada também em diferentes tipos de lesão, especialmente na lesão da bolsa incubadora em estágio avançado, parecendo sua presença ser mais consequência de infecção secundária do que como patógeno inicial.

Levando em consideração que espécies de *Vibrio* estão entre as maiores causadoras de doenças bacterianas em sistemas de cultivo, causando altas taxas de mortalidade (Actis et al., 1999; Koldewey et al., 2005), a presença de cepas de *V. harveyi* e *V. owensii* no indivíduo com lesão na bolsa incubadora em estágio inicial contribui para afirmar a potencial virulência destas espécies como causadoras de patologia, especialmente, *V. harveyi*, já anteriormente descrita como causadora de problemas de pele com necrose de tecido, letargia e hemorragia interna, e precursora de taxas de mortalidade em cavalos-marinhos (Tendencia, 2004; Declercq et al., 2014; Thampi Raj et al., 2009; Alcaide et al., 2001). *V. owensii*, embora não tenha sido anteriormente descrita como patógeno para espécies de peixes, Ushijima e colaboradores (2012) a descreveram como responsável pela necrose de tecido e morte no coral *Montipora capitata* em ambiente natural.

A presença de bactérias também descritas como patogênicas a outros organismos marinhos, como, por exemplo, *K. palustris*, *V. harveyi*, *R. crassostreae* tanto em lesões como em amostras da água, e as altas concentrações de bactérias em geral encontradas nas amostras de água dos aquários, podem estar associadas às elevações nos níveis de compostos orgânicos nitrogenados nos períodos com registros de indivíduos doentes no cultivo. Isso nos leva a concluir, de forma geral, que alterações nos níveis de nitrito e

amônia em SCF para *H. reidi* contribuíram para a virulência de espécies de bactérias patogênicas e oportunistas.

6. RECOMENDAÇÕES PARA O CULTIVO

Diante dos resultados obtidos, algumas recomendações podem ser estabelecidas para otimizar o equilíbrio de sistemas de manutenção para *H. reidi*, especificamente na ocorrência de animais doentes. *H. reidi* deve ser mantida, preferencialmente, em SCF, quando mantidos em sistemas sem filtração, concentrações de nitrito e amônia, devem ser monitoradas diariamente, tendo em vista as constantes flutuações de compostos nitrogenados, e o volume de trocas parciais de água devem assegurar que os valores destes se mantenham baixos. Já em SCF, pode-se optar por um monitoramento das concentrações a cada dois ou três dias, entretanto, o controle de fatores externos e observações diárias devem ser mantidos com rigor, tendo em vista que pequenas oscilações da qualidade da água nesses sistemas, também podem contribuir para o número de animais doentes.

Mesmo que não tenham apresentado alterações no presente estudo, outros parâmetros físico-químicos da água também devem ser monitorados e mantidos constantes, tendo em vista que elevações de temperatura podem levar ao aumento da concentração de bactérias patogênicas na água. Assim, a água a ser repostada nos aquários deve possuir a mesma salinidade e pH dos aquários dos cavalos-marinhos, bem como, deve ser mantida uma temperatura constante.

A quarentena de animais doentes, especialmente de animais com lesões, deve ser feita imediatamente a constatação da lesão havendo monitoramento diário com trocas totais de água do aquário de quarentena, tendo em vista que a concentração de bactérias nas lesões é proporcional ao tamanho das mesmas. Os equipamentos e materiais utilizados em aquários de quarentena devem ser utilizados exclusivamente nesses aquários, evitando reintrodução de patógenos nos sistemas de manutenção.

Outro fator que merece atenção é a higiene e assepsia no ambiente do cultivo. O acesso aos sistemas de manutenção deve ser restrito, sendo a higienização de mãos e braços feita anteriormente a qualquer contato com a água e equipamentos dos aquários.

Após alimentação, resíduos de alimento e dejetos devem ser removidos por meio de sifonação, para que estes não contribuam para alterações nas concentrações de compostos nitrogenados.

Todo material utilizado em atividades de manutenção do protocolo de cultivo (alimentação, higienização dos aquários) devem ser limpos e desinfetados depois de utilizados.

7. CONCLUSÕES

- Sistemas de circulação fechada são essenciais para o cultivo de *H. reidi* mantendo concentrações de nitrito e amônia estáveis em comparação a sistemas sem filtração. Entretanto, fatores externos e variáveis (e.g. alteração do tipo e quantidade de alimento ofertado, e no controle de filtração UV ou mecânica da água) não controladas podem interferir na estabilidade do sistema, contribuindo para o surgimento de indivíduos doentes;
- O número de indivíduos doentes tanto em SCF quanto em SI está diretamente associado a aumento nos níveis de nitrito e amônia;
- Dermatites são as principais doenças no cultivo de *Hippocampus reidi*, gerando quadros clínicos severos, com morte dos indivíduos, geralmente por espécies de bactérias patogênicas ou patogênicas oportunistas, como por exemplo, *Kocuria palustris*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio owensii*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus saprophyticus*.

REFERÊNCIAS

- AGATA N., OHTA M., ARAKAWA Y., MORI M., The *bceT* gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxic protein, *Microbiology* 141 (1995) 983–988.
- ANDERSON, P. A.; PETTY, B. D. 2012. Mixed Metazoan and Bacterial Infection of the Gas Bladder of the Lined Seahorse—A Case Report. *Journal of Aquatic Animal Health*. v. 25.
- BALCÁZAR JL, de BLAS I, RUIZ-ZARZUELA I, VENDRELL D, GIRONE'S O, MÚZQUIZ JL. 2007a. Sequencing of variable regions of the 16S rRNA gene for identification of lactic acid bacteria isolated from the intestinal microbiota of healthy salmonids. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 30:111–118
- BALCÁZAR JL, VENDRELL D, de BLAS I, RUIZ-ZARZUELA I, GIRONÉS O, MÚZQUIZ JL. 2007b. Quantitative detection of *Aeromonas salmonicida* in fish tissue by real-time PCR using selfquenched, fluorogenic primers. *J Med Microbiol* 56: 323–328
- BALCÁZAR, J. L.; GALLO-BUENO, A.; PLANAS, M.; PINTADO, J. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from captive-bred seahorses with disease symptoms. *Antoine van Leeuwenhoek*. v.97 p. 207 – 210. 2010.
- BAUM, J. K.; VINCENT, A. C. J. **Magnitude and inferred impacts of the seahorse trade in Latin America**. *Environmental Conservation*, v. 32, p. 305-319, 2005.
- BEECHER D.J., SCHOENI J.L., WONG A.C.L., Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*, *Infect.Immun.* 63 (1995) 4423–4428.
- BEVERIDGE, M. C. M. (1984). Cage and pen fish farming. Carrying capacity models and environmental impact. *FAO Fish Tech. Pap.* 255, pp. 133.
- BROWN, R.J. GOWEN, D.S. MCLUSKY. **The effect of salmon farming on the benthos of a Scottish sea loch** *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 109 (1987), pp. 39–51
- CLARRIDGE, J. E. 2004. **Impacto f 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases**. *Clin. Microbiol. Rev.* v.17, n.4, p. 840-62, table of contents.
- CARDOZO, L. M. S. 2011. Evaluación del efecto del alimento vivo enriquecido en el crecimiento y supervivencia de crías de caballito de mar *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 (Teleostei: Syngnathidae) en condiciones de cautiverio. Universidad del Magdalena. Colombia.
- CASTRO, A.L.C; DINIZ, A.F.; MARTINS, I.Z.; VENDEL, A.L.; OLIVEIRA, T.P.R.; ROSA, I.L. 2008. Assessing diet composition of seahorses in the wild using a non destructive method: *Hippocampus reidi* (Teleostei: Synhnathidae) as a study-case. *Neotropical Ichthyology*, v.6, n.4, p.637-644.
- COLE, J. R., WANG, Q., CARDENAS, E., FISH, J., CHAI, B., FARRIS, R. J., KULAM-SYED-MOHIDEEN, A. S., MCGARREL, D. M., MARSH, T., GARRITY, G.M., TIEDJE, J.M. 2008. **The ribosomal database project: Improved alignments and**

new tools for rRNA analysis. Nucleic Acid Research. Vol 37. doi: 101093/nar/gkn879

DAWES, 2008. **Wild-caught marine species and the ornamental aquatic industry.** Marine Ornamental Species, Collection, Culture and Conservation.

DAWES et al., 1998. **Responde of the tropical seaweed *Glacilaria cornea*, salinity and irradiance.** Journal of aplyed phycology.

DOYLE M.P., **Foodborne Bacterial Pathogens.** Marcel Dekker Inc., New York, 1989,pp. 21–70.

DROBNIIEWSKI F.A., ***Bacillus cereus* and related species**, Clin.Microb. Rev. 6 (1993) 324–338.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED STATION) 2014. **The state of world fisheries and aquaculture – Opportunities and challenges.** E-ISBN 978-92-5-108276-8 (PDF)

FOSTER, S. J.; VINCENT, A. C. J. 2004. **Life history and ecology of seahorses: implications for conservation and management.** Journal of Fish Biology v.65, pl-61.

GUARNER F, MALAGELADA JR. 2003. **Gut flora in health and disease.** Lancet. ;361:512–519

GRUTTER, A. S.; PANKURST N. W. 2000. **The effects of capture, handling, confinement and ectoparasite on plasma levels of cortisol, glucose and lactate in the coral reef fish *Hemigymnus melapterus*.** *J Fish Biol.* 57, 391–401

HOFF, F. H. 1996. **Conditioning spawning and rearing of fish with emphasis on marine clownfish.** Florida Aquaculture Consultants. 120p.

HORA, M.S.C.; JOYEUX, J.C. 2009. **Closing the reproductive cycle: Growth of the seahorse *Hippocampus reidi* (Teleostei, Syngnathidae) from birth to adulthood under experimental conditions.** Aquaculture: v.292. p.37-41.

IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened. Version 2010.4. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>

JOB, S. D.; DOB, H. H.; MEEUWIG, J. J.; e HALL, H. J. 2002. Culturing the oceanic seahorse, (*Hippocampus kuda*). Aquaculture. v.214, p.333 – 341.

JOB, S. D.; BUU, D. e VINCENT, A. 2006. Growth and survival of the tiger tail seahorse, (*Hippocampus comes*). Journal of the World Aquaculture Society. v.37 p.:322 – 327.

KEMMERLY S.A., PANKEY G.A., Oral ciprofloxacin therapy for *Bacillus cereus* wound infection and bacteremia, Clin.Infect. Dis. 16 (1993) 189.

- KINKELIN, P.; MICHEL; C. GHITTINO. P. 1991. Tratado de las Enfermedades de los Peces. Zaragoza, Espanha, Ed. Acribia, 353p.
- KOLDEWEY, H. J. 2005. Syngnathid Husbandry in Public Aquariums – 2005 Manual. Project Seahorse - Zoological Society of London, Regent's Park, London.
- KOLDEWEY, H. J.; MARTIN-SMITH, K. M. ; 2010. A global review of seahorse aquaculture. *Aquaculture*. v.302 p.131 – 152.
- KOTIRANTA A.K., Ito H., HAAPASALO M.P.P., LOUNATMAA K., Radiation sensitivity of *Bacillus cereus* with and without acrySTALLINE surface protein layer, *FEMS Microbiol. Lett.* 179(1999) 275–280.
- LARSEN H.D., JØRGENSEN K., Growth of *Bacillus cereus* inpasteurized milk products, *Int. J. Food Microbiol.* 46(1999) 173–176.
- LIAO, W.R., LIN, J.Y., Shieh, W.Y., JENG, W.L. e HUANG, R. 2003. Antibiotic activity of lectins from marine algae against marine vibrios. *J Indus Microbiol Biotechnol*, 30, 433-439.
- LIN, Q.; GAO, Y.; SHENG, J.; CHEN, Q.; ZHANG, B.; e LU, J.; 2007. The effects of food and the sum of effective temperature on the embryonic development of the seahorse, *Hippocampus kuda* Bleeker. *Aquaculture*. v.262, p.481 – 492.
- LIN, Q.; LIN, J. e ZHANG, D. 2008. Breeding and juvenile culture of the lined seahorse, (*Hippocampus erectus*) Perry, 1810. *Aquaculture*. v.277, p.287 – 292.
- LIVENGGOOD, E. J. CHAPMAN, F.A. The ornamental fish trade: An introduction with perspective for responsible aquarium fish ownership. Department of fisheries and Aquatic Sciences. University of Florida. 2011
- LOURIE, S. A., VINCENT, A. C. J., HALL, H. J. **Seahorses: an identification guide to the world's species and their conservation**. Project Seahorse, London, UK. 1999, 214pp.
- LUDWIG, W; SCHLEIFER, K. H. 1994. **Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis**. *FEMS Microbiol Rev.* v 15, n. 2-3, p. 155-173.
- LUND T., GRANUM P.E., Characterisation of a nonhaemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak, *FEMS Microbiol. Lett.* 141 (1996) 151–156.
- MASONJONES, H.D. ; LEWIS, S.M. 2000. Differences in potential reproductive rates of male and female seahorses related to courtship roles. *Anim. Behav.*, 59, pp. 11–20
- MARIN, V.A. et al. 2006 **Deteção de patógenos presentes nos alimentos: A falta de padronização e validação de métodos moleculares no Brasil**. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 20,n. 145, p. 46-50.

- MARTINS, M. L.; MOURIÑO, J. P. L.; G.FEZER, G. F.; BUGLIONE NETO, C. C.; GARCIA, P.; SILVA, B. C.; JATOBÁ, A. e VIEIRA, F. N. Isolation and experimental infection with *Vibrio alginolyticus* in the sea horse, *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 (Osteichthyes: Syngnathidae) in Brazil. *Braz. J. Biol.* vol. 70, no. 1, p. 205-209. 2010.
- MARTINEZ-CARDENAS, L.; PURSER, G. J. 2007. Effect of tan colour on *Artemia* ingestion, growth and survival in cultured early juvenile potbellied seahorse (*H. abdominalis*) *Aquaculture*. v. 264. p. 92-100.
- MAKRIDIS, P., COSTA, R.A. e DINIS, M.T. 2006. Microbial conditions and antimicrobial activity in cultures of two microalgae species, *Tetraselmis chuii* and *Chlorella minutissima*, and effect on bacterial load of enriched *Artemia metanauplii*. *Aquaculture*, 255, 76-81.
- MILLER-MORGAN, 2010. **A brief overview of the ornamental fish industry and hobby**. Blackwell Publishing. USA
- MICHAUD L. (2007) – Microbial communities of recirculating aquaculture facilities: interaction between heterotrophic and autotrophic bacteria and the system itself -PhD Dissertation in “*Scienze Ambientali: Ambiente Marino e Risorse*” (XVIII CICLO), University of Messina.
- NCBI RESOURCE COORDINATORS. 2012. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acid Research*. Vol. 41. Doi: 10.1093/nar/gks1189
- OLIVOTTO, I.; AVELLA, M. A.; SAMPAOLESI, G.; PICCINETTI, C. G.; NAVARRO RUIZ, P. & CARNEVALI, O.; 2008 Breeding and rearing the longsnout seahorse *Hippocampus reidi*: Rearing and feeding studies. *Aquaculture*. v.283 p. 92-96.
- OLIVOTTO, I.; PLANAS, M.; SIMÕES, N.; HOLT, G. J.; AVELLA, M. A.; CALADOR. 2011. Advances in breeding and rearing marine ornamentals. *Journal of the World Aquaculture Society*. V. 42 p. 135 – 166.
- PADILLA,D.K.;WILLIAMS,S.L. 2004.Beyond ballast water: aquarium and ornamental trades as sources of invasive species in aquatic ecosystems. *Frontiers in ecology and the environment*.V.2.,p.131-38.
DOI: 10.1890/1540295(2004)002[0131:BBWAAO]2.0.CO;2
- PALMA, J.; ANDRADE, J. P. 2012. Growth, Reproductive Performances, and Brood Quality of Long Snout Seahorse, *Hippocampus guttulatus*, fed enriched shrimp diets.*Journal of the world aquaculture society*. v.46 p.802-813.
- PAYNE, M. F.; RIPPINGALE, R. J. 2000. Rearing West Australian seahorse, (*Hippocampus subelongatus*), juveniles on copepod nauplii and enriched *Artemia*.*Aquaculture*. v.188 p.353 – 361.
- PIRTTIJÄRVI T.S.M., ANDERSSON M.A., SCOGING A.C., SALKINOJA-SALONEN M.S., Evaluation of methods for recognizing strains of the *Bacillus*

cereus group with food poisoning potential among industrial and environmental contaminants, System. Appl. Microbiol. 22 (1999) 133–144.

PRIEST F.G., Biotechnology Handbooks, vol. 2, Plenum Press, New York, 1989, pp. 27–56.

RHYNE, et al., 2014. **Is sustainable exploitation of coral reefs possible?** A view from the standpoint of the marine aquarium trade. Environmental change issues.

ROBERTS, R.J. 1981. Patologia de los Peces. MlIndi Prensa, Madrid, 366p.

ROBERTS, R.; BULLOCK. A.M. 1980. The skin surface ecosystem of teleost fishes. Proc. R. Soc. Edinbu rg 79 B: 87-91.

RUSUL G., YAACOB N.H., Prevalence of *Bacillus cereus* in selected foods and detection of enterotoxin using TECRAVIA and BCET-RPLA, Int. J. Food Microbiol. 25 (1995) 131–139.

SAMPAIO e NOTTINGHAM, 2008. **Guia para identificação de peixes ornamentais brasileiros: espécies marinhas.** Ministério do Meio Ambiente – IBAMA.

SATO K., ICHIYAMA S., OHMURA M., TAKASHI M., AGATA N. Ohta M., NAKASHIMA N., A case of urinary tract infection caused by *Bacillus cereus* (Lett.), J. Infect. 36 (1998) 247–248.

SALTER, C. E. et al., 2012. Dermatitis and systemic mycosis in lined seahorses *Hippocampus erectus* associated with a marine-adapted *Fusarium solani* species complex pathogen. Diseases of Aquatic Organisms. v. 101. p. 23 – 31.

SOUZA-SANTOS, L.P.; REGIS, C.G.; MÉLO, R.C.S.; CAVALLI, R.O. 2013. Prey selection of juvenile seahorse *Hippocampus reidi*. Aquaculture, 404-405: 35-40.

SUN, Y. et. al, 2007. Application for Bioinformatics Computing Grid. Bioinformatics. V. 23, n.9, p. 1175-7.

THAMPI RAJ, S.; LIPTON, A. P. e CHAUHAN, G. S. Characterization and infectivity evaluation of *Vibrio harveyi* causing white patch disease among captive reared seahorses, *Hippocampus kuda*. Indian journal of Marine Sciences. v. 39. p. 151 – 156.

TURNBULL P.C.B., Kramer J.M., Non-gastrointestinal *Bacillus cereus* infections: an analysis of exotoxin production by strains isolated over a two-year period, J. Clin. Pathol. 36(1983) 1091–1096.

THOMPSON et al., 2001. **Genomic diversity among *Vibrio* isolates from different sources determined by fluorescence amplified fragment length polymorphism.** Systematic and Applied Microbiology. Vol 24. 520-538.

TLUSTY, M., 2002. **The benefits and risks of aquacultural production for the aquarium trade.** Aquaculture 205, 203–219;

- VINCENT, A. C. J., e SADLER, L. M. 1995 - Faithful pair bonds in wild seahorses, *Hippocampus whitei*, *Animal Behaviour*. 50; 1557-1569.
- VINCENT, A. C. J.; FOSTER, S. J.; KOLDEWEY, H. J. 2011. Conservation and management of seahorses and others Syngnathidae, *Journal of Fish Biology*, v. 78, p. 1681-1724.
- WILLADINO, L., L.P. SOUZA-SANTOS, R.C.S. MÉLO, A.P. BRITO, N.C.S. BARROS, C.M.V. ARAÚJO-CASTRO, D.B. GALVÃO, A. GOUVEIA, C.G. REGIS & R.O. CAVALLI 2012. Ingestion rate, survival and growth of newly released seahorse *Hippocampus reidi* fed exclusively on cultured live food items. *Aquaculture*, 360-361, 10-16.
- WOODS, C. M. C. 2000a. Preliminary observations on breeding and rearing the seahorse *Hippocampus abdominalis* Leeson, 1827 (Teleostei: Syngnathidae) in captivity. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*. v. 34, p. 475 – 485.
- WOODS, C. M. C. 2000b. Improving initial survival in cultured seahorses, *Hippocampus abdominalis* Leeson, 1827 (Teleostei: Syngnathidae). *Aquaculture*. v. 190, p.377 – 388.
- WOODS, C.M.C. 2002. Natural diet of the seahorse *Hippocampus abdominalis*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 36(4): 655–660.
- WOODS, C. M. C.2003a. Effects of varying *Artemia* enrichment on growth and survival of juvenile seahorses, *Hippocampus abdominalis*. *Aquaculture* v.220 p. 537 – 548.
- WOODS, C. M. C.2003b. Growth and survival of juvenile seahorse *Hippocampus abdominalis* reared on live, frozen and artificial foods. *Aquaculture*. v. 220, p.287 – 298.
- WOODS, C. M. C. 2003c. Effect of stocking density and gender segregation in the seahorse *Hippocampus abdominalis*. *Aquaculture*. v.218, p.167 – 176.
- WOODS, C. M. C.; Valentino, F. 2003. Frozen mysids as an alternative to live *Artemia* in culturing seahorses *Hippocampus abdominalis*. *Aquaculture Research* v.34, p. 757 – 763
- WOODS, C. M. C.2005. Growth of cultured seahorses (*Hippocampus abdominalis*) in relation to feed ratio. *Aquaculture International*. v. 13, p.305 – 314.
- WOESE, C. R. 1987. **Bacterial evolution. Microbiological Reviews**. 51 (2): 221-271.
- WONG, J. M.; BENZIE, J. A. H. 2003. The effects of temperature, *Artemia* enrichment, stocking density and light on the growth of juvenile seahorses, *Hippocampus whitei* (Bleeker, 1855), from Australia. *Aquaculture* v.228 p.107 – 121.
- WILSON, M. J.; VINCENT, A. C. J. 1998. Preliminary success in closing the life cycle of exploited seahorse species, *Hippocampus* spp., in captivity. *Aquarium Sciences and Conservations*, v. 2 p. 179-196.

- THAMPI RAJ, S.; LIPTON, A. P. e CHAUHAN, G. S. Characterization and infectivity evaluation of *Vibrio harveyi* causing white patch disease among captive reared seahorses, *Hippocampus kuda*. Indian journal of Marine Sciences. v. 39. p. 151 – 156.
- TENDENCIA, E. A. 2004. **The first report of *Vibrio harveyi* infection in the sea horse *Hippocampus kuda* Bleekers 1852 in the Philippines.** - Aquaculture Research.
- DECLERCQ, A. M. K CHIERS, W den BROECK. 2014. **White necrotic tail tips in stuary seahorses, *Hippocampus kuda*, Bleeker- Journal of fish.** Wiley Online library
- SOUZA-SANTOS, L.P.; REGIS, C.G.; MÉLO, R.C.S.; CAVALLI, R.O. 2013. Prey selection of juvenile seahorse *Hippocampus reidi*. Aquaculture, 404-405: 35-40.
- ACTIS et al, 1999. Analysis of the replication elements of the pMJ101 plasmid from the fish pathogen *Vibrio ordalii*. [Elsevier](#).
- BALCÁZAR, J. L.; GALLO-BUENO, A.; PLANAS, M.; PINTADO, J. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from captive-bred seahorses with disease symptoms. Antoine van Leeuwenhoek. v.97 p. 207 – 210. 2010.
- WANG et al., 2016. Comparison of Intestinal Microbiota in Intestinal Tracts of the Wild and Cultured **Seahorses**, *Hippocampus trimaculatus* (Leach). Journal of the World Aquaculture.
- TANU D.D.D., KHANDEPARKER R., SREEPADA R., SANAYE S.V. e PAWAR H.B. (2011) A study on bacteria associated with the intestinal tract of farmed yellow seahorse, *Hippocampus kuda* (Bleeker, 1852): characterization and extracellular enzymes. Aquaculture Research 43, 1–9.
- GIOVANNONI e STINGL. **Molecular diversity and ecology of microbial plankton.** - Nature, 2005
- GEVERS, FM COHAN, JG LAWRENCE, BG SPRAT. 2005. **Re-evaluating prokaryotic species.** Nature Reviews.
- COHAN e PERRY, 2007. **A systematics for discovering the fundamental units of bacterial diversity-** Current Biology, 2007 – Elsevier.
- BEREITERV-HAHN, et al., 1980. **Composition and formation of flame cell caps: A substratum for the attachment of micro-organisms to sea horse epidermis.** Proceedings of the Royal Society of Edinburgh. Section B. Vol 79. Pp 105-112.
- MUELLER, et al, 2012. **Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes.** Microbiology and Molecular Biology Reviews. **vol. 76 no. 2** 444-49

ROBERTS e BULLOK, 1980. **The skin surface ecosystem of teleost fishes.** Proceedings of the Royal Society of Edinburgh. Vol 79/ Issue 1-3. P87-91

SUGITA et al., 1992. **Application of ozone disinfection to remove *Enterococcus seriolicida*, *Pasteurella piscicida*, and *Vibrio anguillarum* from seawater.**

LOURIE, S. A. et al. 2004 .A Guide to the Identification of Seahorses. Project Seahorse and TRAFFIC North America. Washington D.C.: University of British Columbia and World Wildlife Fund.

PALMA, J. ; ANDRADE, J. P. 2012. Growth, Reprouitive Performances, and Brood Quality of Long Snout Seahorse, *Hippocampus guttulatus*, fed enriched shrimp diets. Journal of the world aquaculture society. v.46 p.802-813.

VINCENT e CLIFTON-HADLEY, 1989. **Parasitic infection of the seahorse (*Hippocampus erectus*)-a case report.** RS - Journal of Wildlife Diseases, - BioOne

BOMBARDINI, D FLORIO, L FICHTEL, ML FIORAVANTI. 2006 **The main disease of *Syngnathidae* in captivity.** Ittiopatologia.

LE PAGE et al., 2015. **Diseases of captive yellow seahorse *Hippocampus kuda* Bleeker, pot-bellied seahorse *Hippocampus abdominalis*. Lesson and weedy seadragon *Phyllopteryx taeniolatus*.** Journal of Fishe Diseases.

Garland M.R., Lawler L.P., Whitaker B.R., Walker I.D.F. & Corl F.M. (2002) Modern CT application in veterinary medicine. RadioGraphics 22, 55–62.

Willens S., Dunn J.L. & Frasca S. Jr (2004) **Fibrosarcoma of the brood pouch in an aquarium-reared lined seahorse (*Hippocampus erectus*).** Journal of Zoo and Wildlife Medicine 35, 107–109.

LEWISCH, M KUCERA, R TAPPERT Occurrence of nephrolithiasis in a population of longsnout **seahorse**, *Hippocampus reidi* Ginsburg, and analysis of a nephrolith 2013- Journal of fish Disease.

NOGA et al., 2011 **Fish disease: diagnosis and treatment.**

SCHREIER, N MIRZOYAN, K SAITO. 2010. **Microbial diversity of biological filters in recirculating aquaculture systems.** 2010 Current opinion in biotechnology, Elsevier

NOGUEIRA, E. C. **Cavalos-marinheiros em cativeiro: avaliação do conhecimento biológico e das condições de manutenção em lojas especializadas na cidade de São Paulo.** 2007. Monografia (Especialização) – Funiber Brasil, São Paulo, 2007.

MURUGAN, A.; DHANYA, S; SREEPADA, R. A.; RAJAGOPAL, S.; BALASUBRAMANIAN, T. **Breeding and mass-scale rearing of three spotted seahorse, Proposta de Plano de Gestão para o Uso Sustentável dos Cavalos-Marinheiros do Brasil** 101 Hippocamp

WARDLEY, T., 2001. **Pot-bellied seahorses and their colours**. Masters Thesis, University of Tasmania, 98p.

KUITER, R.H., 2000. **Seahorses, Pipefishes and Their Relatives. A Comprehensive Guide to Syngnathiforms**. TMC Publishing, Solesbridge Lane, Chorleywood, Herts WD3 5SX, UK. 240pgns.

NELSON, J. S. 2006. **Fishes of the world**. John Wiley and Sons, Inc. 4 ed. New York. 601 p. ISBN: 0-471-25031-7.

KUITER, R.H., 2000. **Seahorses, Pipefishes and Their Relatives. A Comprehensive Guide to Syngnathiforms**. TMC Publishing, Solesbridge Lane, Chorleywood, Herts WD3 5SX, UK. 240pgns.

KOLDEWEY, H. 2005. **Seahorse husbandry in public aquariums: 2005 Manual, with chapters contributed by members of the Syngnathid discussion group**. London, UK: Zoological Society of London.

FALEIRO et al, 2008. **Seahorse behaviour and aquaculture: How to improve Hippocampus guttulatus husbandry and reproduction?** Aquaculture.

BERGET, B. A.; WAINRIGHT, P. C. 1997 **Morphology and kinematics of prey capture in the syngnathid fishes Hippocampus erectus and Syngnathus floridae**. Marine Biology v.127, p563-570.

OTERO-FERRER, L MOLINA, J SOCORRO. 2010. **Live prey first feeding regimes for short-snouted seahorse Hippocampus hippocampus (Linnaeus, 1758) juveniles**. Aquaculture.

SEALE, A. 1993. **Brine shrimp (Artemia) as a satisfactory live food for fishes**. American Fisheries Society, n.63, p.129-130.

VAN WASSENBERGH, S.; ROOS, G.; GENBRUGGE, A.; LEYSEN, H.; AERTS, P.; ADRIAENS, D.; HERREL, A.; 2009. **Suction is kid's play: extremely fast suction in newborn seahorses**, Biol. Lett. 5 p,200-203.

ROSA, I. L.; BARROS A. T.; XAVIER J. H. A.; CORTEZ C. S. 2005. **Dados populacionais de cavalos-marinhos *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 (Teleostei: Syngnathidae) capturados para fins de aquarismo no Nordeste do Brasil. Boletim Técnico Científico do CEPENE, 13, 1: 25-38.**

ROSA, I.L. (2005) National Report - Brazil. In: Bruckner, A.W.; Fields, J.D.; Daves, N. (eds) **The Proceedings of the International Workshop on CITES Implementation for Seahorse Conservation and Trade**. NOAA Technical Memorandum NMFS-OPR-35. 1 ed. vol 1. Silver Spring, p46-53.

ROSA, I.L.; SAMPAIO, C.L.; BARROS, A.T. (2006) Collaborative monitoring of the ornamental trade of seahorses and pipefishes (Teleostei: Syngnathidae) in Brazil: Bahia state as a case study. *Neotropical Ichthyology*. v.4, n. 2, p 247-252.

MAI, A. C. G.; ROSA, I. L. 2009. Aspectos ecológicos do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* no estuário Camurupim/Cardoso, Piauí, Brasil, fornecendo subsídios para a criação de uma Área de Proteção Integral. *Biota Neotrop*. v. 9. n. 3. p. 85-91.