

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE
AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS

JOYCE ANDREIA DOS SANTOS

**Efeitos do pH sobre a incubação e o desenvolvimento inicial de peixes com
diferentes estratégias reprodutivas**

Maringá
2017

JOYCE ANDREIA DOS SANTOS

Efeitos do pH sobre a incubação e o desenvolvimento inicial de peixes com diferentes estratégias reprodutivas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Área de concentração: Ciências Ambientais

Orientadora: Dr.^a Andréa Bialetzki

Maringá
2017

"Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)"
(Biblioteca Setorial - UEM. Nupélia, Maringá, PR, Brasil)

S237e Santos, Joyce Andreia dos, 1991-
Efeitos do pH sobre a incubação e o desenvolvimento inicial de peixes com diferentes estratégias reprodutivas / Joyce Andreia dos Santos. -- Maringá, 2017.
36 f. : il. (algumas color.).
Dissertação (mestrado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais)--
Universidade Estadual de Maringá, Dep. de Biologia, 2017.
Orientadora: Dr.^a Andréa Bialezki.
1. Peixes de água doce - Ovos e larvas - Influência do pH - Reprodução. 2. Peixes de água doce - Ovos e larvas - Incubação e larvicultura - Influência do pH. 3. Ictioplâncton - Reprodução - Influência do pH. 4. Ictioplâncton - Incubação e larvicultura - Influência do pH. I. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Biologia. Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais.

CDD 23. ed. -597.156
NBR/CIP - 12899 AACR/2

JOYCE ANDREIA DOS SANTOS

Efeitos do pH sobre a incubação e o desenvolvimento inicial de peixes com diferentes estratégias reprodutivas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Dr.^a Andréa Bialetzki
Nupélia/Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Prof. Dr. Pitágoras Augusto Piana
Universidade Estadual de Londrina (UNIOESTE)

Aprovada em: 02 de março de 2017.

Local de defesa: Anfiteatro Prof. “Keyshiu Nakatani”, Nupélia, Bloco G-90, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

Dedico este trabalho a primeiramente a Deus
e a minha mãe por estar sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, porque ele me carrega no colo nos momentos em que mais preciso;

Agradeço a minha mãe, a minha heroína, minha guerreira e que me ensinou a correr atrás dos meus objetivos, sempre estando ao meu lado e me apoiando nas minhas decisões. Também ao meu irmão, que apesar de não demonstrar a todo o momento eu sei que ele torce muito por mim;

Agradeço à minha orientadora Dr.^a Andréa, que me ensinou a ter ética profissional, a amar o trabalho sem esquecer-se da família, a quem eu me espelho como profissional e a pela paciência de me aguentar nesses sete anos de laboratório, onde cresci como pessoa e profissional, e pelos conselhos de uma verdadeira mãe científica;

Ao Programa de Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PEA-UEM), pela oportunidade de participar de um curso tão renomado e apoio financeiro Proex/Capes;

A CAPES pelo fornecimento da bolsa;

À Aquicultura Piracema pelo fornecimento do material biológico;

A equipe do laboratório de Ecologia de Ictioplâncton: Andréa, Miro, Ji, Eliana, Marcinha, Gazo e Rafa pelos conselhos, amizade e lanches da tarde;

Agradeço do fundo do meu coração ao Miro, que me ajudou desde a elaboração do projeto, me ensinou a rotina de um experimento, a lidar com as adversidades encontradas nesse processo, ajudou-me nas análises dos dados e nas correções da dissertação. Conclusão: sempre estive ao meu lado me apoiando;

Também tenho que agradecer imensamente a Jislaine (Ji), que foi uma irmã pra mim, pelas viagens de coleta, pelos perrengues do dia-a-dia no laboratório, sempre me incentivando e me ajudando em tudo que eu precisei, também pela Maju a sua filhinha por me fazer ter orgulho de uma criança tão linda;

A Marcinha e a Eliana pela ajuda nos experimentos, e pelo apoio emocional no dia-a-dia. E também à Camila pela ajuda nas correções da dissertação, nas análises estatísticas e apoio psicológico;

Aos professores do PEA pela contribuição na minha formação acadêmica. A todos os funcionários do Nupélia (secretaria, informática, biólogos, equipe de apoio de campo de Maringá e na base em Porto Rico) que de maneira direta e indireta contribuíram em todos esses anos de Nupélia. Aos funcionários da biblioteca (Salette e João) que sempre estiveram à disposição;

A Glau (amiga/irmã), Thais, Manu, Thiago, Fer, Nati, Luisi, Aline, Axel, pela amizade e companheirismo, e sempre estiveram presente nas minhas diversas etapas e sempre acreditando em mim;

Aos amigos do PEA, e da graduação pela amizade: Jaqueline Dittrich pelo companheirismo nas disciplinas e na amizade que apesar da distância se manteve forte, Barbara, Lívia, Eliezer, Jéssica, Carol, Nicolli, Matheus Maximilian, Adeline, Mari, Tayenne, Gra e Tânia e os demais que porventura faltou mencionar;

Ao Drº Pitágoras Augusto Piana por toda ajuda nas análises estatísticas;

A todos meus amigos, pelas orações e incentivo, Haise, Mônica, Camila, Maycon, Rafael, Paulo Tiago, Ludy e os demais.

Efeitos do pH sobre a incubação e o desenvolvimento inicial de peixes com diferentes estratégias reprodutivas

RESUMO

A reprodução dos peixes em ambiente natural tende a ocorrer em condições ideais para a sobrevivência da prole. Dentre estas condições os valores extremos de pH podem afetar diferentemente os estágios iniciais das espécies de peixe. Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar a influência do pH sobre a sobrevivência e o desenvolvimento inicial de duas espécies de peixes com diferentes estratégias reprodutivas, *Astyanax lacustris* (migrador de pequenas distâncias) e *Piaractus mesopotamicus* (migrador de longas distâncias). Os experimentos foram divididos em dois ensaios (incubação e larvicultura) com cinco níveis de pH. O primeiro ensaio realizado foi a incubação, por meio de um sistema de recirculação de água com auxílio de incubadoras confeccionadas com garrafas pets de 2 litros. Já o segundo ensaio executado foi a larvicultura, onde foram utilizados aquários de três litros. O pH não influenciou na taxa de eclosão dos ovos de *A. lacustris*, mas afetou o diâmetro do vitelo, enquanto as larvas recém-eclodidas apresentaram algumas deformidades esqueléticas. *Piaractus mesopotamicus* sofreu efeito do pH na taxa de eclosão e no espaço perivitelino, enquanto as larvas recém-eclodidas apresentaram várias deformidades esqueléticas. Na larvicultura de *A. lacustris* não foram observados efeitos sobre a taxa de sobrevivência das larvas, porém as variáveis analisadas apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. A taxa de sobrevivência de *P. mesopotamicus* foi afetada pelo pH ácido e todas as variáveis analisadas também variaram significativamente entre os tratamentos. Conclui-se que os ensaios com incubação e larvicultura de *A. lacustris* e *P. mesopotamicus* revelaram uma influência importante e diferenciada da variável pH sobre a sobrevivência e o desenvolvimento destas espécies.

Palavras-chave: *Astyanax lacustris*. Ictioplâncton. pH. *Piaractus mesopotamicus*.

Effects of pH on an incubation and initial development of fish with different reproductions of strategies.

ABSTRACT

Reproduction of fish in a natural environment tends to occur in ideal conditions for offspring survival. Among these conditions the extreme values of pH can affect the initial stages of fish species differently. In this context, this study aimed to evaluate the influence of pH on the survival and early development of two species of fish with different reproductive strategies, *Astyanax lacustris* (small distance migrant) and *Piaractus mesopotamicus* (long distance migrator). The experiments were divided into two trials (incubation and larviculture) with five pH levels. The first test was the incubation, by means of a water recirculation system with the aid of incubators made with 2-liter pet bottles. The second test was the larviculture, where three-liter aquaria were used. The pH did not influence the hatching rate of *A. lacustris* eggs, but affected the diameter of the calf, while the newly hatched larvae presented some skeletal deformities. *Piaractus mesopotamicus* had a pH effect on hatching rate and perivitelline space, while newly hatched larvae had several skeletal deformities. In *A. lacustris* larviculture there were no effects on larval survival, but the variables analyzed showed significant differences between treatments. The survival rate of *P. mesopotamicus* was affected by acid pH and all variables analyzed also varied significantly between treatments. It is concluded that the incubation and larviculture assays of *A. lacustris* and *P. mesopotamicus* revealed a significant and differentiated influence of the pH variable on the survival and development of these species.

Keywords: *Astyanax lacustris*. Ichthyoplankton. pH. *Piaractus mesopotamicus*.

Dissertação elaborada (exceto idioma) e formatada conforme a norma da publicação científica *Aquaculture*. Disponível em:<
<https://www.journals.elsevier.com/aquaculture/>>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 MATERIAL E MÉTODOS	11
2.1 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE pH	11
2.2 REPRODUÇÃO INDUZIDA E OBTENÇÃO DOS OVOS E LARVAS	11
2.3 ENSAIOS DE INCUBAÇÃO. EFEITO DO PH SOBRE O TEMPO DE INCUBAÇÃO, TAXA DE ECLOSÃO E DESENVOLVIMENTO DE OVOS DE <i>A. lacustris</i> e <i>P.</i> <i>mesopotamicus</i>	12
2.4 ENSAIOS DE LARVICULTURA. EFEITO DO pH SOBRE A SOBREVIVÊNCIA E O DESENVOLVIMENTO LARVAL DE <i>A. lacustris</i> e <i>P. mesopotamicus</i>	14
2.4.1 Monitoramento das variáveis físico e químicas.....	16
2.5 ANÁLISE DOS DADOS	16
3 RESULTADOS	17
3.1 Incubação	17
3.2 Larvicultura	25
4 DISCUSSÃO	29
REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

No ambiente natural a reprodução dos peixes ocorre de maneira cíclica, com um período de repouso intercalado por períodos de atividade sexual (Godinho, 2007). No geral, essa periodicidade é observada para todas as espécies de água doce, onde a desova tende a ocorrer quando o ambiente apresenta as condições ideais para a sobrevivência da prole (Agostinho *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2009).

Welcomme (1979) afirma que na maioria dos peixes de planícies de inundação esta sazonalidade coincide com o período de cheia, o que é corroborado para a planície de inundação do alto rio Paraná (Vazzoler, 1996), onde a maior atividade reprodutiva dos peixes ocorre entre novembro e fevereiro. No entanto, os fatores bióticos e abióticos, como temperatura, precipitação, nível da água, oxigênio, condutividade elétrica, pH, alcalinidade, fotoperíodo, nutrientes e disponibilidade de alimentos (Welcomme, 1979; Lowe-McConnell 1987; Bye, 1989; Munro, 1990; Vazzoler, 1996; Vazzoler *et al.*, 1997), podem sinalizar, acelerar ou retardar o processo reprodutivo, afetando a incubação dos ovos, o desenvolvimento e o crescimento, bem como a sobrevivência das larvas (Korwin-Kossakowski, 1989; Nakatani *et al.*, 2001).

Os requerimentos ambientais exigidos pelos peixes durante o seu desenvolvimento inicial são diferentes dos adultos, isso porque ovos e larvas são muitas vezes mais vulneráveis às perturbações ambientais do que os adultos (Werner, 2002). Baumgartner *et al.*, (2008) reportam que espécies de peixes pertencentes a diferentes guildas reprodutivas apresentam respostas distintas às variáveis ambientais durante a reprodução. Por outro lado, Kipper (2015) discute que as espécies podem ser influenciadas individualmente, no entanto, dependendo das estratégias de reprodução, podem apresentar a mesma resposta em relação a uma dada variável ambiental.

A preocupação com os requerimentos ambientais exigidos pelos períodos iniciais de desenvolvimento dos peixes se justifica pelo fato de que durante esta etapa da vida são registradas as maiores taxas de mortalidade. Assim, Wener (2002) elenca três dimensões do meio que influenciam a sobrevivência e o crescimento dos estágios iniciais de desenvolvimento: física (temperatura, luz, proteção mecânica, abrigo contra predadores e velocidade de corrente), química (concentração de oxigênio dissolvido, pH, salinidade e concentração de poluentes) e biológica (recursos alimentares).

Estudos experimentais buscam compreender como cada uma destas dimensões e suas variáveis atuam sobre o desenvolvimento inicial das espécies. Entre as principais variáveis

analisadas podemos citar o fotoperíodo (Reynalte-Tataje *et al.*, 2002; Kitagawa, 2012), a temperatura (Okamoto, 2004; Rebouças *et al.*, 2014), a amônia, o oxigênio dissolvido (Gazzola, 2003; Weiss, 2007) e o pH (Curiacos, 1999; Ferreira *et al.*, 2001; Zaniboni-Filho *et al.*, 2009; Gosmann, 2012; Reynalte-Tataje *et al.*, 2015).

Nos ecossistemas aquáticos o pH é uma variável influenciada por vários fatores abióticos como concentrações de substâncias húmicas, tipo de solo, entrada alóctone e autóctone de carbono orgânico e inorgânico dissolvido, entre outros, mas também por fatores bióticos, como respiração dos organismos, fotossíntese e processos de decomposição (Esteves *et al.*, 2011). As alterações nesta variável têm efeitos diretos sobre as comunidades aquáticas em geral, pois alteram os processos de permeabilidade da membrana plasmática, interferindo nos processos iônicos intra e extracelulares entre os organismos e o meio (Esteves *et al.*, 2011). Para os peixes, valores extremos de pH podem afetar o crescimento normal das espécies (Zweig *et al.*, 1999), além de ser muito tóxico, particularmente na regulação iônica (Scott *et al.*, 2005), levando ao colapso do sistema circulatório e, eventualmente, a morte dos organismos (VanDijk *et al.*, 1993). Já para os estágios iniciais de desenvolvimento, os estudos indicam uma maior sensibilidade à diminuição de pH, devido à superfície elevada em relação ao volume e a falta de mecanismos especializados para a regulação ácido-base (Kikkawa *et al.*, 2003; Ishimatsu *et al.*, 2008).

Os ambientes encontrados na planície são muito heterogêneos apresentando diferentes concentrações de pH e também distintas respostas específicas à esta variável (Baumgartner *et al.*, 1997; Nakatani *et al.*, 1997). Entretanto, o efeito isolado desta variável sobre o desenvolvimento inicial dos peixes ainda é pouco conhecido, mas é provável que as espécies apresentem graus de tolerância diferenciados. Neste contexto, com o objetivo de avaliar a influência do pH sobre a sobrevivência e o desenvolvimento inicial de peixes com diferentes estratégias reprodutivas, selecionamos para este estudo duas espécies nativas da região, pertencentes a diferentes guildas reprodutivas e com importância para a pesca comercial, o lambari - *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875) (Characiformes: Characidae) (migrador de curta distância com desova parcelada, Suzuki *et al.*, (2004)), e o pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (Characiformes: Serrasalminidae) (migrador de longa distância com desova total, Suzuki *et al.*, (2004)). A hipótese norteadora deste estudo é que distintos níveis de pH influenciarão diferentemente a sobrevivência e o desenvolvimento inicial de ambas espécies. Nossa predição é que valores extremos de pH influenciarão no tempo de incubação e na sobrevivência dos ovos, bem como na sobrevivência e no desenvolvimento morfológico das larvas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE pH

A fim de reproduzir as condições que os peixes encontram no seu habitat natural, a amplitude de pH foi determinada pela variação encontrada nos distintos ambientes da planície de inundação do alto rio Paraná entre 2000 a 2013, cedido pelo Laboratório de Limnologia do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia) da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

A partir destas observações foram estipulados cinco níveis equidistantes entre 5 e 9.

2.2 REPRODUÇÃO INDUZIDA E OBTENÇÃO DOS OVOS E LARVAS

Os experimentos para ambas espécies foram realizados entre os meses de novembro de 2015 e janeiro de 2016 e foram aprovados pelo Comitê de Ética do uso de animais da Universidade Estadual de Maringá (protocolada sob o CEUA nº 3743070416).

Os adultos de *A. lacustris* foram capturados na planície de inundação do alto rio Paraná, transportados para o Laboratório de Ecologia Aplicada do Nupélia, da Universidade Estadual de Maringá, em caixas com aeração e permaneceram em tanques de estoque de reprodutores com volume útil de 800L, recebendo ração comercial para peixes (26% proteína bruta).

Após um período de aclimação, foram separados para o processo de indução hormonal 20 fêmeas e 20 machos, que ficaram em jejum por 24 horas antes do procedimento. A indução foi realizada utilizando extrato de hipófise de carpa (EHC), o qual foi aplicado em doses únicas tanto para as fêmeas como para os machos nas concentrações de 5,0 mg/kg e de 2,5 mg/kg, respectivamente. Após a indução, 20 casais foram separados e acondicionados em duas cubas (10 em cada) com capacidade para 250L, cobertas com uma manta de tela sombrite 70%. Para a manutenção da temperatura foram usados aquecedores de 250 Watts com termostatos à 26 °C. Após seis horas da aplicação de hormônio (180 horas/graus) iniciou-se a observação do comportamento dos peixes a cada meia hora. Posteriormente, ao início do comportamento de coorte do macho, no qual este se pareava e perseguia as fêmeas, houve desova seminatural de parte das fêmeas. Porém, para algumas fêmeas foi necessário a realização do processo de extrusão e fertilização a seco.

A reprodução induzida de *P. mesopotamicus* foi realizada nas dependências da Piscicultura Piracema (Maringá, Paraná) com matrizes do próprio local. Este procedimento foi realizado de forma convencional com a utilização de 6mg/kg de EHC, dividida em duas doses

para as fêmeas, com intervalo de oito horas e 2 mg/kg em dose única nos machos, simultaneamente à segunda dose das fêmeas. Após a fertilização e hidratação dos ovos, estes foram acondicionados em sacos plásticos com oxigênio comprimido, colocados em caixas de isopor e transportados por cerca de meia hora para o Laboratório de Ecologia Aplicada do Nupélia, onde foram realizados os experimentos.

2.3 ENSAIOS DE INCUBAÇÃO. EFEITO DO pH SOBRE O TEMPO DE INCUBAÇÃO, TAXA DE ECLOSÃO E DESENVOLVIMENTO DE OVOS DE *A. lacustris* e *P. mesopotamicus*.

Para ambas as espécies foram utilizadas 20 incubadoras cônicas de 2L confeccionadas com garrafas pet sustentadas por suportes de barras de ferro, as quais foram dispostas em uma prateleira com sistemas de recirculação da água com diferentes níveis de pH e aeração constante para movimentação dos ovos na coluna d'água. Além dessas, foram mantidas seis incubadoras controle de 20L de fibra de vidro.

A água utilizada no experimento foi proveniente do poço artesiano que abastece a Universidade Estadual de Maringá (UEM) misturada com água do abastecimento da Companhia de Saneamento do Paraná (SANEPAR) na proporção de 1:1, sendo tratada com 15-ml de solução de 12,6% de tiosulfeto de sódio para inativar o cloro e deixada em descanso com aeração por 07 dias.

Para os experimentos foram empregados para as duas espécies cinco tratamentos com níveis de pH 5 ($5,14 \pm 0,09$); 6 ($6,14 \pm 0,12$); 7 ($7,13 \pm 0,06$); 8 ($8,21 \pm 0,05$); e 9 ($9,19 \pm 0,05$) para *A. lacustris* e 5 ($5,14 \pm 0,05$); 6 ($6,18 \pm 0,03$); 7 ($7,16 \pm 0,06$); 8 ($8,42 \pm 0,25$); e 9 ($9,28 \pm 0,03$) para *P. mesopotamicus*, os quais foram obtidos através da média das correções realizadas diariamente. Para a manutenção dos diferentes níveis de pH foi utilizada uma solução de ácido sulfúrico 0,2N para acidificar e uma solução de hidróxido de sódio (10%) para alcalinizar, sendo os aquários monitorados a cada quatro horas e quando necessário, realizadas as correções, durante todo o período experimental. A temperatura foi mantida em 26°C, utilizando termostatos de 200 Wts, enquanto a concentração de oxigênio foi mantida acima de 5 mg.L^{-1} por meio de um sistema de aeração, com pedras porosas, ligado a um soprador de ar.

Os tratamentos foram distribuídos em um delineamento inteiramente ao acaso, com quatro repetições cada. A fim de padronizar o volume de ovos foi utilizada uma densidade de oito ml de ovos por unidade experimental.

Cada tratamento, composto de quatro incubadoras, foi contido em um sistema de recirculação disposto em uma prateleira de metal. No nível superior da prateleira havia um aquário (50L) com aeração, onde o pH foi corrigido para o valor pretendido, da base deste aquário a água descia por força da gravidade por um cano de PVC o qual estava acoplado a torneiras de onde saíam as mangueiras que se encaixavam na base das incubadoras. Na superfície superior da incubadora havia um orifício com outra mangueira encaixada para a saída da água que descia por gravidade até o aquário de retorno (30L). Por fim, passando por biofiltros a água voltava ao aquário superior com auxílio de uma bomba submersa (500 Wt) (Figura 1).

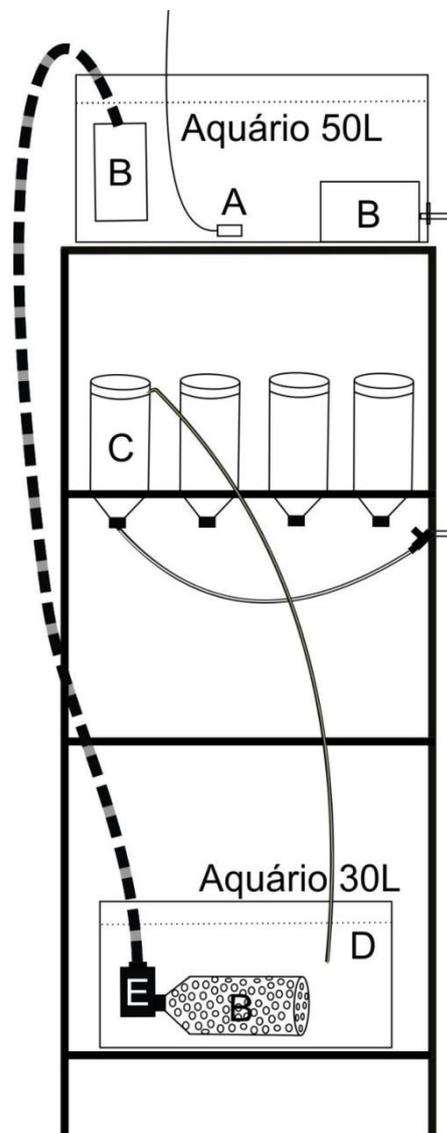


Figura 1. Representação do sistema de recirculação de água para incubação de ovos de *Astyanax lacustris* e *Piaractus mesopotamicus* nos diferentes níveis de pH (A= soprador de ar, B= biofiltro de garrafa pet e espuma, C.= incubadoras confeccionadas com garrafas pets 2L, D= aquário, E= Bomba submersa de 500 Watts).

A duração dos ensaios de incubação foi determinada pela finalização do processo de eclosão de pelo menos 95% das larvas sobressalentes que estavam na incubadora controle.

Os experimentos de incubação de *A. lacustris* e *P. mesopotamicus* tiveram a duração de 22 horas e de 16 horas e 45 minutos, respectivamente, sendo que os ovos foram coletados, duas, cinco e dez horas após a fertilização, retirando-se quando possível até quatro ovos por incubadora, fixando-os em formol 4%, tamponado com carbonato de cálcio. Ao final do experimento, foram separados os ovos viáveis, inviáveis e danificados, assim como as larvas viáveis e as larvas danificadas. Após a separação foi avaliada a taxa de eclosão, calculada através da equação: $Te = \frac{\text{número de larvas eclodidas}}{(\text{Número de ovos mortos} + \text{número de larvas})} \times 100$. Posteriormente, foram obtidos o diâmetro dos ovos e do vitelo e o tamanho do espaço perivitelino, enquanto para as larvas foram medidos o comprimento total e padrão, o comprimento da cabeça e a altura da cabeça e do corpo, sendo obtido também o peso tanto dos ovos quanto das larvas.

Todas as medidas foram expressas em milímetros e obtidas utilizando um microscópio estereoscópico equipado com câmera digital para o emprego do programa computacional OPHTD (Opticam Microscopy Technology), seguindo as recomendações de Ahlstrom *et al.*, (1976) e Bagenal e Braum (1978). O peso dos ovos e das larvas recém-eclodidas foi mensurado utilizando-se uma balança analítica com precisão de 0,0001 g.

2.4 ENSAIOS DE LARVICULTURA. EFEITO DO pH SOBRE A SOBREVIVÊNCIA E O DESENVOLVIMENTO LARVAL DE *A. lacustris* e *P. mesopotamicus*

Para os ensaios de larvicultura foi utilizada água proveniente do poço artesiano que abastece a Universidade Estadual de Maringá (UEM) misturada com água do abastecimento da Companhia de Saneamento do Paraná (SANEPAR) na proporção de 1:1, sendo tratada com 15-mL de solução de 12,6% de tiosulfeto de sódio para inativar o cloro e deixada em descanso com aeração por 07 dias.

Os ovos das duas espécies foram acondicionados em incubadoras com temperatura de 25°C e pH 7, onde foram monitorados até a sua eclosão. Após este processo, as larvas foram dispostas em aquários experimentais de 2,5L em cinco tratamentos com concentrações de pH de 5 (5,08±0,08); 6 (6,13±0,10); 7 (7,14±0,08); 8 (8,32±0,18); 9 (9,30±0,21) para *A. lacustris* e 5 (5,17±0,18); 6 (6,25±0,20); 7 (7,19±0,13); 8 (8,30±0,24); 9 (9,35±0,21) para *P. mesopotamicus* distribuídos em um delineamento inteiramente ao acaso, com quatro repetições cada. Em cada unidade experimental foram utilizadas 25 larvas. Nos experimentos

as amostras foram aleatorizadas e os aquários dispostos em uma bancada de concreto, todos no mesmo nível.

Para a manutenção dos valores de pH nos diferentes valores preconizados foi realizada a correção utilizando uma solução de ácido sulfúrico 0,1N para acidificar e uma solução de hidróxido de sódio (10%) para alcalinizar. A temperatura foi mantida por meio de banho-maria à 26°C, utilizando bandejas com água e termostato, enquanto a concentração de oxigênio foi mantida acima de 7 mg.L⁻¹ por meio de um sistema de aeração, com pedras porosas, ligado a um soprador de ar.

Para a padronização do fotoperíodo, todas as janelas do laboratório foram cobertas com lona e as larvas foram expostas ao fotoperíodo artificial, sendo os aquários iluminados por luz fluorescente de 15W das 07:30 às 19:30 horas. A alimentação foi realizada a partir da filtragem de plâncton selvagem provenientes de lagoas da planície do alto rio Paraná, inoculados em caixas de 150 litros, sendo estes concentrados e distribuídos nos aquários com auxílio de uma pipeta de Pasteur de 3mL, além de náuplios de *Artemia* spp. Para a eclosão dos cistos de *Artemia* spp. foram utilizadas incubadoras de 2,5L confeccionadas com garrafa pet abastecidas com água contendo 35ppm de cloreto de sódio, com aeração e iluminação constante. Após 24 horas de incubação, os náuplios foram retirados das incubadoras, peneirados e emergidos em água doce para retirada da água salgada. A alimentação foi fornecida com auxílio de uma pipeta de três mL, três vezes ao dia. Diariamente os aquários foram sifonados para a limpeza e o volume de água retirado foi repostado.

O experimento foi conduzido durante 30 dias e ao final foram coletadas todas as larvas sobreviventes, as quais foram acondicionadas em frascos devidamente identificados e, em seguida, fixadas em formol 4%, tamponado com carbonato de cálcio (Reynalte-Tataje & Zaniboni Filho, 2008).

No início do experimento foi obtida uma amostra de 25 larvas para tomada das medidas iniciais de comprimento total, comprimento padrão, comprimento da cabeça, altura da cabeça, altura do corpo e peso. Ao final do período experimental as larvas de cada unidade experimental foram contadas e, em seguida anestesiadas com solução de Benzocaina (1 grama para 10mL de álcool) e fixadas em solução de formol 4%, tamponado com carbonato de cálcio. Em laboratório foram obtidos o comprimento total, comprimento padrão, comprimento da cabeça, altura da cabeça e altura do corpo (mm) por meio de microscópio estereoscópio equipado com câmera digital com o emprego do programa computacional OPHTD (Opticam Microscopy Technology). Também foi observada a ocorrência de deformidades esqueléticas,

as quais foram avaliadas e classificadas de acordo com Gavaia *et al.*, (2002). O peso final das larvas também foi mensurado utilizando-se uma balança analítica com precisão de 0,0001 mg.

A sobrevivência das larvas em cada tratamento foi calculada através da equação: $S = (\text{número de larvas vivas ao final do experimento} / \text{número inicial de larvas}) \times 100$.

2.4.1 Monitoramento das variáveis físico e químicas

Durante o experimento foram monitoradas diariamente às 8:00 horas, a temperatura, por meio de termômetro de mercúrio e a condutividade elétrica e o oxigênio dissolvido, utilizando aparelhos eletrônicos digitais. Já o pH foi monitorado e corrigido diariamente duas vezes ao dia, às 8:00 e às 18:00 horas.

2.5 ANÁLISE DOS DADOS

Para verificar se houve efeito das variações dos níveis de pH sobre a taxa de eclosão, diâmetro do ovo, espaço perivitelino e diâmetro do vitelo no tratamento de incubação e sobre a taxa de sobrevivência, comprimento total e padrão, comprimento da cabeça, altura da cabeça, altura do corpo, peso e percentagem de larvas com deformidades esqueléticas no experimento de larvicultura, foi realizada primeiramente uma Análise de Variância (ANOVA) *one-way*, e quando os resultados foram significativos uma análise de *post-hoc* (LSD) foi realizada para verificar quais tratamentos diferiram entre si. Para as variáveis que não atenderam os pressupostos de normalidade e homocedastidade foi realizada uma Análise de Variância não paramétrica de Kruskal-Wallis e teste Z.

Após o resultado *post-hoc* (LSD) dos tratamentos diferenciados significativamente foi realizado um teste de significância multivariado com o objetivo de comparar tendências lineares e quadráticas do efeito do pH sobre as duas espécies estudadas. A partir destes resultados realizamos uma Análise de Covariância (ANCOVA) para os dados com efeitos lineares, e para os dados com efeitos quadráticos foi realizada uma Análise de Variância Multivariada (MANCOVA) polinomial de ordem dois. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa Statistica 7.0 software (StatSoft, 2005) e o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Incubação

Qualidade da água

No experimento de incubação, os parâmetros físicos e químicos foram controlados e não foram observadas grandes variações. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Valores médios (X) e desvio padrão (DP) dos parâmetros físicos e químicos nos diferentes tratamentos do experimento de incubação realizados com ovos de *Astyanax lacustris* e *Piaractus mesopotamicus*.

Níveis de pH	Parâmetros físicos e químicos		
	Condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Oxigênio dissolvido (mg/L)
<i>Astyanax lacustris</i>			
5,14 \pm 0,09	193,6 \pm 3,02	26,27 \pm 0,06	5,05 \pm 0,08
6,14 \pm 0,12	181,40 \pm 1,28	25,40 \pm 0,00	5,71 \pm 0,05
7,13 \pm 0,06	181,17 \pm 0,65	25,79 \pm 0,09	5,08 \pm 0,20
8,21 \pm 0,05	179,67 \pm 4,91	24,93 \pm 0,06	5,64 \pm 0,04
9,19 \pm 0,05	281,33 \pm 22,72	25,70 \pm 0,10	5,55 \pm 0,01
<i>Piaractus mesopotamicus</i>			
5,14 \pm 0,05	203,33 \pm 1,53	27,10 \pm 0,60	8,95 \pm 0,48
6,18 \pm 0,03	177,9 \pm 1,99	27,13 \pm 0,57	8,57 \pm 0,40
7,16 \pm 0,06	173,07 \pm 1,07	27,10 \pm 0,75	8,95 \pm 0,11
8,42 \pm 0,25	175,5 \pm 4,80	27,16 \pm 0,61	8,50 \pm 0,26
9,28 \pm 0,03	209,50 \pm 12,13	27,07 \pm 0,61	8,75 \pm 0,21

O ensaio de incubação dos ovos de *A. lacustris* teve início às 10:00 horas do dia 17/11/2015 e durou 22 horas até o momento da eclosão das larvas, por volta das 8:00 horas do dia seguinte. Para *P. mesopotamicus* o ensaio teve início às 18:00 horas do dia 08/12/2015 e durou 16 horas e 45 minutos até o momento da eclosão das larvas às 10:45 minutos do dia seguinte.

Os ovos de *A. lacustris* podem ser caracterizados como adesivos, por ficarem na sua maioria, aderidos às bordas das incubadoras; e pequenos, com pouco espaço perivitelino por possuírem diâmetro do vitelo grande, enquanto os de *P. mesopotamicus* apresentaram amplo espaço perivitelino, sendo considerados grandes (sensu Nakatani et al., 2001) (Figura 2 e 3). Após a análise do percentual de ovos embrionados de *A. lacustris* ao fim do experimento, verificou-se que o tempo de incubação (22 horas) não foi afetado ($F = 1,03$; $p = 0,42$) pelo pH. Através de inspeção visual foi possível constatar que os ovos apresentaram um padrão de desenvolvimento semelhante em todos os tratamentos, com exceção do tratamento do pH de 5,14 que apresentou um aumento no número de ovos inviáveis após 12 horas de incubação.

Para *P. mesopotamicus* o percentual de ovos embrionados também não foi afetado ($H = 8,60$; $p = 0,07$) pelo pH, ou seja, o tempo de incubação não foi influenciado pelos níveis de pH empregados neste estudo. Entretanto, através da análise visual verificamos que os ovos apresentaram um padrão de desenvolvimento influenciado pelos diferentes níveis de pH. Após duas horas de execução do experimento, 64% dos ovos do tratamento com pH de 5,14 apresentaram-se inviáveis.

Durante o período de incubação de *A. lacustris* não foram verificadas entre os tratamentos diferenças significativas (ANOVA one-way ou Kruskal-Wallis) no peso, no diâmetro do ovo e no espaço perivitelino. Já o diâmetro do vitelo diferiu entre os níveis de pH, apresentando maiores valores no tratamento com pH de 8,21 e menores no pH de 6,14 (Tabela 2). Os ovos inviáveis não apresentaram deformidades no córion, contudo houve rompimento do vitelo, apresentando uma coloração esbranquiçada nos tratamentos com pH de 5,14, 8,21 e 9,19 (Figura 2).

Para o ensaio de incubação de *P. mesopotamicus*, a análise de variância não atestou diferenças significativas para o peso, diâmetro dos ovos e diâmetro do vitelo em relação os diferentes níveis de pH (Tabela 3). Já o espaço perivitelino apresentou diferenças significativas, com maiores valores no tratamento do pH de 8,42 e menores no 6,18 (Tabela 2).

Os ovos desta espécie apresentaram nos tratamentos do pH de 5,14 e de 6,18 deformidades no córion, além da coloração esbranquiçada do vitelo (Figura 3-D). Uma das deformidades mais evidente foi à divisão do córion em duas partes (Figura 3E).

Tabela 2. Valores médios (X), desvio padrão (DP) e resultados das análises de variância (Anova e Kruskal-Wallis) das medidas morfométricas (mm) e peso (gramas) obtidas em ovos de *Astyanax lacustris* e de *Piaractus mesopotamicus* após incubação em diferentes níveis de pH (DO= Diâmetro do ovo; EP= Espaço perivitelino; DV= diâmetro do vitelo). Em negrito, valores que diferiram significativamente.

Medidas (X±DP)	Tratamentos					Anova		Kruskal-Wallis	
	5,14	6,14	7,13	8,21	9,19	F	P	H	P
<i>Astyanax lacustris</i>									
Peso	0,0067±0,00	0,0060±0,00	0,0040±0,00	0,0063±0,00	0,0052±0,00	1,47	0,21		
DO	1,05±0,03	1,19±0,27	1,04±0,05	1,07±0,08	1,11±0,07	1,02	0,40		
EP	0,78±0,14	0,56±0,07	0,69±0,11	0,70±0,13	0,63±0,13			2,95	0,06
DV	0,16±0,03	0,16±0,05	0,17±0,03	0,17±0,06	0,16±0,04			14,88	0,01
<i>Piaractus mesopotamicus</i>									
Peso	-	0,0072±0,00	-	0,0093	0,0054	1,47	0,21		
DO	-	2,55±0,09	-	2,57	1,87	1,02	0,40		
EP	-	1,45±0,01	-	1,66	1,40			14,88	0,01
DV	-	0,52±0,08	-	0,45	0,18			2,95	0,57

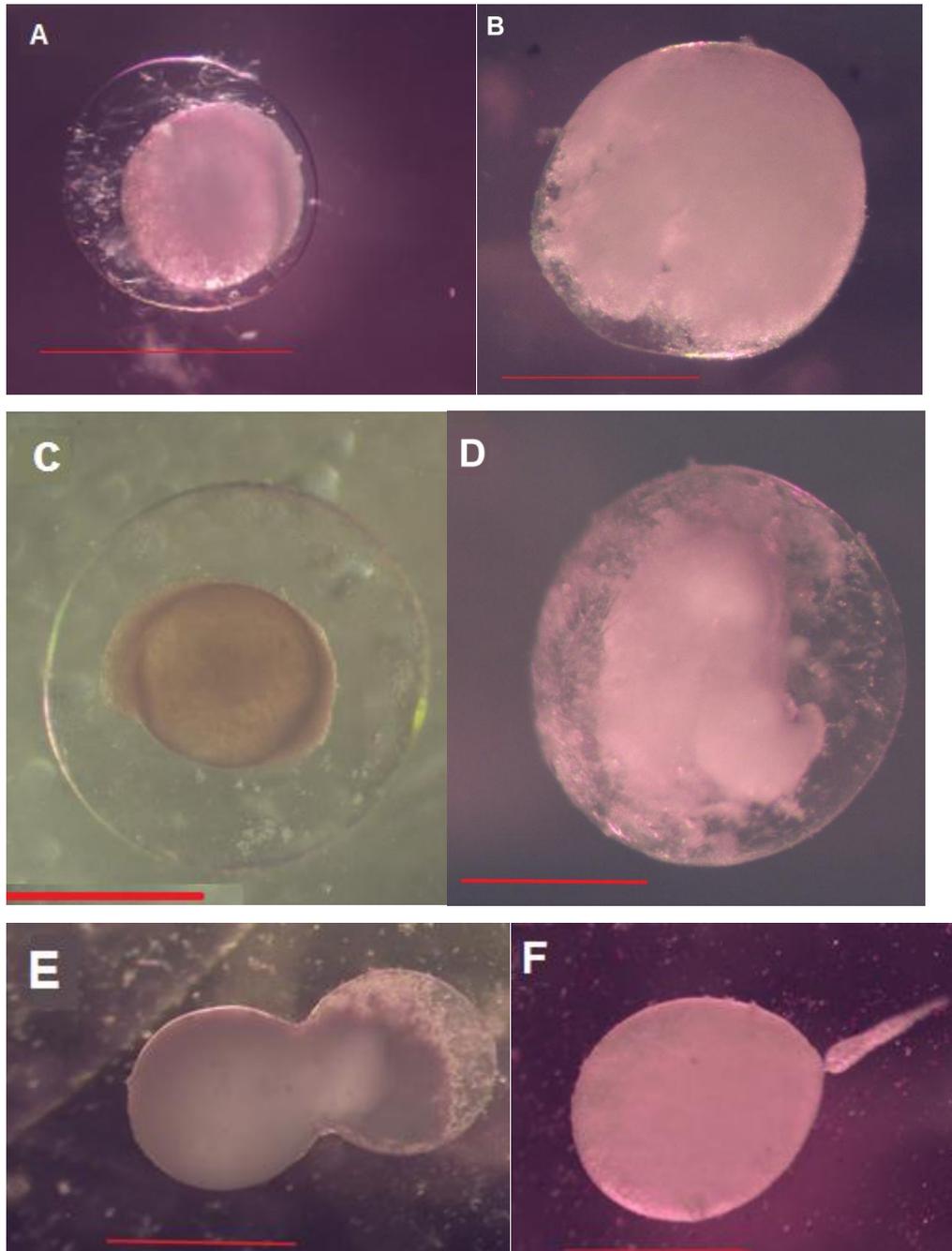


Figura 2. Ovos de *Astyanax lacustris*. a) ovo viável, b) ovo inviável com extravasamento do vitelo para o espaço perivitelino e coloração esbranquiçada. Ovos de *Piaractus mesopotamicus*. C) ovo viável, D) ovo com extravasamento do vitelo para o espaço perivitelino e coloração esbranquiçada; E e F) ovo com malformação

A taxa de eclosão dos ovos foi afetada linearmente pelo pH. Assim sendo, verificou-se efeito significativo do pH sobre uma das espécies (espécie x pH: $F= 33,95$ e $P= 0,00$) (Tabela 3). Pode-se verificar que no experimento de incubação não foi registrado efeito do pH sobre a taxa de eclosão de *A. lacustris* ($F= 0,53$; $P= 0,71$), diferentemente do que foi observado para *P. mesopotamicus* ($F = 222,13$; $p = 0,00$) que apresentou aumento da taxa de eclosão entre os

pH, sendo a maior percentagem de eclosão dos ovos observada no tratamento com pH 9,28 (Figura 3).

Tabela 3. Resultado do Teste de Significância Multivariado do efeito do pH sobre as *Astyanax lacustris* e *Piaractus mesopotamicus*, para as variáveis: Taxa de eclosão (%) dos ovos, Taxa de sobrevivência (%) das larvas e variáveis morfométricas.

Teste de significância						
Efeito	Taxa de eclosão (%)		Taxa de sobrevivência (%)		Variáveis morfométricas	
	F	P	F	P	F	P
Espécie	0,42	0,52	1,18	0,29	67,21	0,00
pH (linear)	30,99	0,00	3,05	0,09	4,87	0,00
pH (quadrado)	0,01	0,91	1,48	0,23	7,31	0,00
Espécie*pH (linear)	33,95	0,00	0,05	0,82	5,76	0,00
Espécie*pH (quadrado)	0,04	0,84	1,35	0,25	3,19	0,05

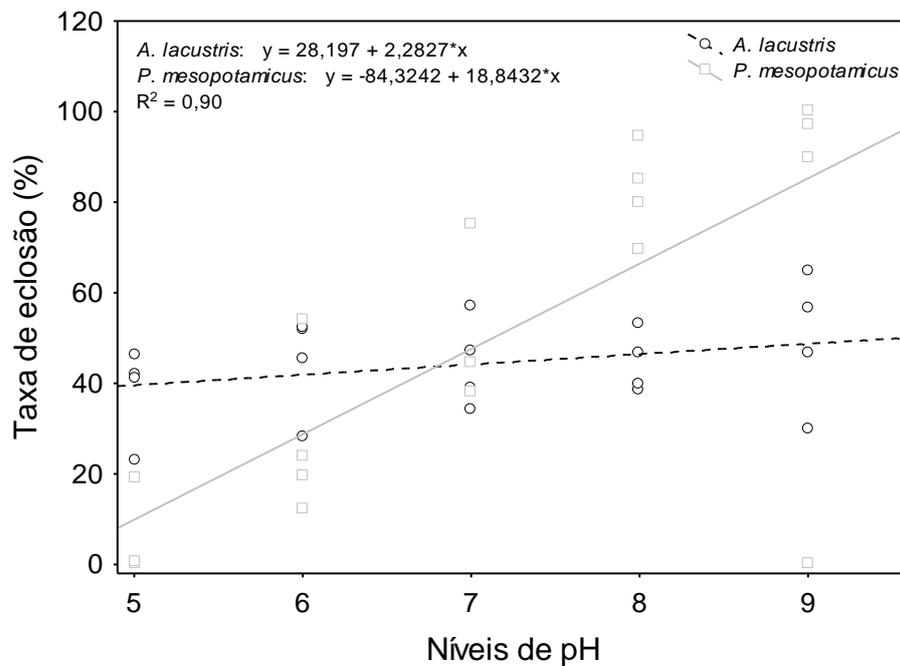


Figura 3. Análise de Covariância (ANCOVA) aplicado à taxa de eclosão dos ovos de *Astyanax lacustris* e *Piaractus mesopotamicus* em função de diferentes níveis de pH.

Os valores médios dos índices morfométricos das larvas recém-eclodidas de *A. lacustris* e *P. mesopotamicus* em diferentes níveis de pH estão apresentados na Tabela 4.

O peso das larvas recém-eclodidas de *A. lacustris* não sofreram efeitos dos diferentes níveis de pH, diferentemente do peso das larvas de *P. mesopotamicus* que sofreram o efeito, sendo os menores valores encontrados no pH de 9,28 e os maiores no de 6,18. Já o comprimento total e o comprimento padrão de *A. lacustris* sofreram os maiores efeitos no tratamento do pH de 5,14 e menores no de 8,21, ao passo que em *P. mesopotamicus* os maiores e os menores valores foram verificados no tratamento com pH de 9,28 e 7,16, respectivamente. Os níveis de pH não causaram efeito sobre o comprimento da cabeça das larvas de *A. lacustris* e de *P. mesopotamicus*, enquanto para a variável altura da cabeça foi observado influência nas larvas de *A. lacustris* pelos tratamentos com pH de 5,14, 6,14, 7,13 e 8,21, sendo os maiores valores no tratamento com pH de 8,21 e menores no de 5,14. A altura do corpo de *A. lacustris* diferiu apenas entre o tratamento com pH de 8,21(maior valor) e no de 5,14 (menor valor), enquanto em *P. mesopotamicus*, as diferenças indicaram maiores valores no pH de 8,42 e menores no de 6,18.

Tabela 4. Valores médios (X), desvio padrão (DP) e análises de variância (Anova e Kruskal-Wallis) das variáveis morfométricas (mm) e peso (gramas) obtidas em larvas recém-eclodidas de *Astyanax lacustris* e *Piaractus mesopotamicus* após incubação em diferentes níveis de pH (CT= Comprimento total; CP= Comprimento padrão; CC= Comprimento da cabeça; AC= Altura da cabeça; ACO= Altura do corpo). Em negrito, valores que diferiram significativamente.

Medidas (X±DP)	Níveis de pH					Anova		Kruskal-Wallis	
	5,14	6,14	7,13	8,21	9,19	F	P	H	P
<i>A. lacustris</i>									
Peso	0,0009±0,00	0,0010±0,00	0,0005±0,00	0,0005±0,00	0,0006±0,00			23,24	0,00
CT	2,65±0,11	2,58±0,12	2,60±0,13	2,53±0,14	2,54±0,22	5,89	0,00		
CP	2,55±0,09	2,50±0,12	2,49±0,13	2,44±0,14	2,48±0,18	4,18	0,00		
CC	0,27±0,03	0,26±0,03	0,26±0,05	0,30±0,33	0,27±0,04	2,23	0,07		
AC	0,54±0,04	0,56±0,04	0,55±0,08	0,63±0,28	0,58±0,06	6,01	0,00		
ACO	0,69±0,05	0,72±0,06	0,72±0,05	0,77±0,26	0,72±0,05	5,02	0,00		
<i>P. mesopotamicus</i>									
Peso	0,0033	0,0038±0,00	0,0026±0,00	0,0027±0,00	0,0018±0,00			43,19	0,00
CT	3,88	3,96±0,13	3,92±0,17	3,96±0,21	4,03±0,20	2,57	0,04		
CP	3,86	3,84±0,12	3,78±0,15	3,84±0,20	3,91±0,19			15,48	0,03
CC	0,31	0,32±0,07	0,32±0,04	0,35±0,06	0,35±0,07	1,81	0,13		
AC	0,60	0,67±0,13	0,64±0,14	0,72±0,16	0,72±0,15	1,83	0,13		
ACO	1,06	1,13±0,11	1,24±0,13	1,28±0,20	1,21±0,14			26,26	0,00

Deformidades esqueléticas foram observadas nas larvas de *A. lacustris*, principalmente, nos níveis de pH extremos, representando 83,76% e 89,90%, nos dois níveis de pH mais ácidos ($5,14 \pm 0,09$ e $6,14 \pm 0,12$, respectivamente) e 86,07% no pH mais básico ($9,19 \pm 0,05$). As principais deformidades encontradas foram à diminuição do comprimento total e do diâmetro do vitelo, bem como o encurvamento do corpo do tipo lordose. As larvas de larvas de *P. mesopotamicus* sofreram efeito do pH de 5,14 registrando 100% de mortalidade. Além disso, diversas deformidades foram verificadas em várias regiões do corpo, principalmente no tratamento com pH de 6,18 (Figura 6B-D). Essas deformidades foram caracterizadas pelo encurvamento do corpo do tipo lordose, diminuição do comprimento total, deformidades no saco vitelino, diminuição do comprimento e altura da cabeça ou até mesmo a ausência da cabeça (Figura 6B-D).

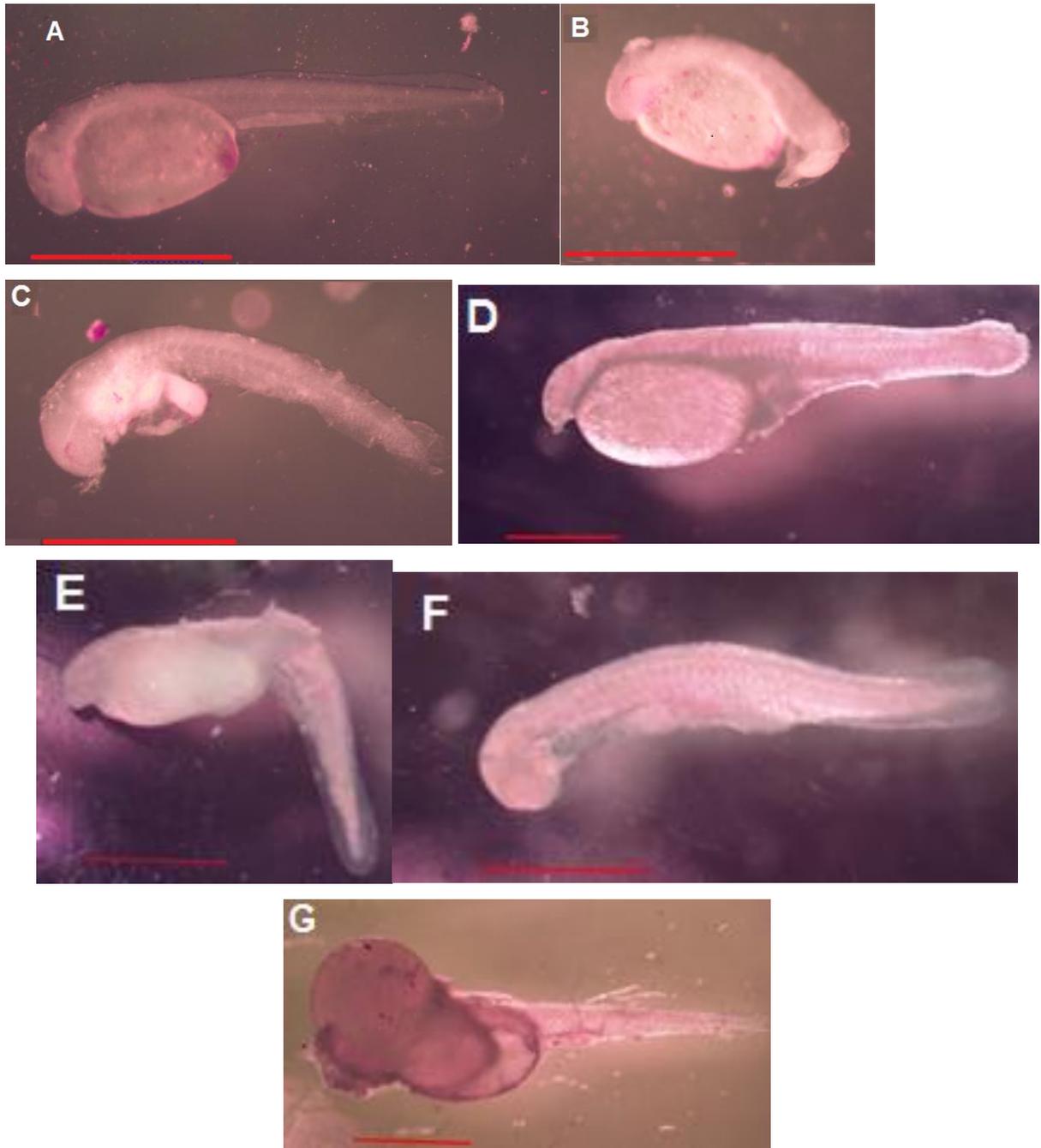


Figura 4. Larvas recém-eclodidas de *Astyanax lacustris* e *Piaractus mesopotamicus* submetidas a diferentes níveis de pH. a) larva viável, b) larva com malformação no desenvolvimento da cauda, c) larva com malformação no vitelo e encurvamento tipo lordose, d) larva viável, e) larva com malformação tipo lordose, f) larva com malformação na cabeça e no vitelo g) larva sem cabeça e com malformação do vitelo.

3.2 Larvicultura

Qualidade da água

Os parâmetros físicos e químicos não apresentaram grandes variações durante o experimento de larvicultura e estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Valores médios (X) e desvio padrão (DP) dos parâmetros físicos e químicos nos diferentes aquários do experimento de larvicultura realizados com larvas de *Astyanax lacustris* e *Piaractus mesopotamicus*.

Níveis de pH	Parâmetros físicos e químicos		
	Condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Oxigênio dissolvido (mg/L)
<i>Astyanax lacustris</i>			
5,08 \pm 0,08	238,88 \pm 29,68	25,98 \pm 0,97	6,51 \pm 1,24
6,13 \pm 0,10	246,40 \pm 44,55	25,90 \pm 0,91	6,57 \pm 1,40
7,14 \pm 0,08	217,66 \pm 30,68	26,05 \pm 0,73	6,26 \pm 1,28
8,32 \pm 0,18	237,42 \pm 38,89	25,46 \pm 1,09	6,56 \pm 1,39
9,30 \pm 0,21	337,89 \pm 64,88	25,50 \pm 1,02	6,56 \pm 1,39
<i>Piaractus mesopotamicus</i>			
5,17 \pm 0,18	265 \pm 36,09	25,03 \pm 0,62	7,30 \pm 0,96
6,25 \pm 0,20	258,60 \pm 38,51	24,94 \pm 0,58	7,11 \pm 0,95
7,19 \pm 0,13	252,88 \pm 37,48	24,97 \pm 0,62	6,92 \pm 0,86
8,30 \pm 0,24	280,39 \pm 52,22	24,96 \pm 0,51	7,02 \pm 0,88
9,35 \pm 0,21	382,07 \pm 81,63	24,96 \pm 0,51	7,02 \pm 0,85

Ao início dos ensaios, as larvas recém-eclodidas de *A. lacustris* permaneceram no fundo do aquário e realizaram apenas natação vertical. Após dois dias da eclosão foi possível observar a abertura bucal das larvas, sendo ofertados 3mL de plâncton filtrado e concentrado, quatro vezes ao dia. No terceiro dia após o início do experimento, as larvas apresentavam natação horizontal e olhos pigmentados, sendo então ofertados a partir do quarto dia do início do experimento, 3mL de náuplios de *Artemia* spp., também quatro vezes ao dia. Para *P. mesopotamicus* as larvas recém-eclodidas apresentaram alta atividade e natação vertical. Após vinte e quatro horas foram ofertados 3mL de plâncton filtrado e concentrado quatro vezes ao dia e após 48 horas iniciou-se a oferta de 3 mL de náuplios de *Artemia* spp, também quatro vezes ao dia. No segundo dia posterior ao início do experimento as larvas apresentaram natação horizontal e pigmentação dos olhos.

A taxa de sobrevivência das larvas nos ensaios de larvicultura o teste de MANCOVA revelou relações linear entre as espécies e o pH (espécie x pH: F= 4,98 e P= 0,00). Para as larvas de *A. lacustris* houve efeito negativo com o aumento do pH (F = 1,87; P = 0,03), diferentemente do que foi observado para larvas de *P. mesopotamicus*, onde o efeito foi

positivo com o aumento do pH ($F = 6,01$; $p = 0,004$), com os maiores valores registrados no tratamento com pH de 9,35 e os menores no pH de 5,17 (Figura 5).

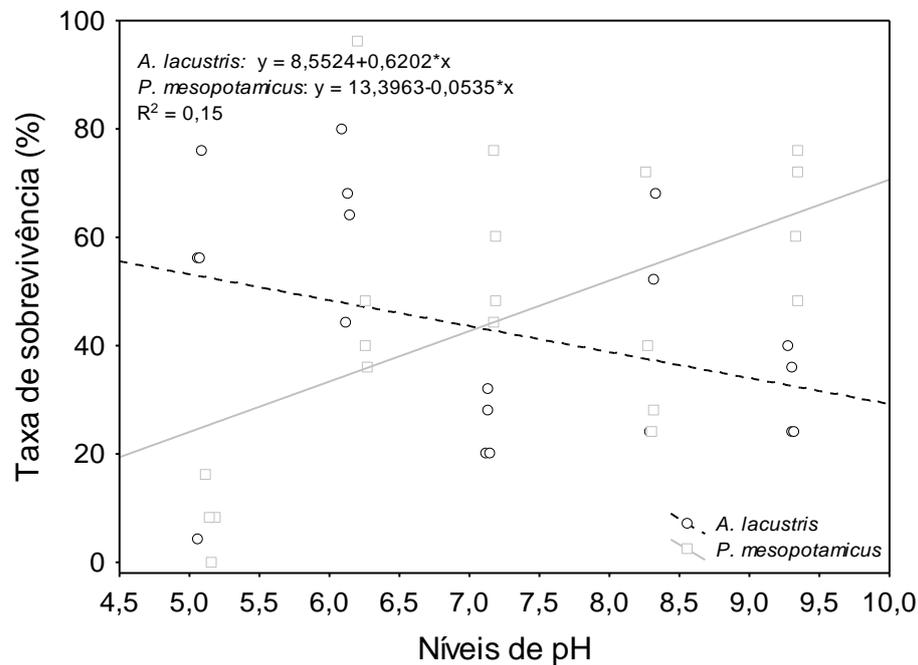


Figura 5. Análise de Covariância (ANCOVA) aplicado à taxa de sobrevivência das larvas de *Astyanax lacustris* e *Piaractus mesopotamicus* em função dos diferentes níveis de pH.

Para as variáveis morfométricas foi observado uma relação quadrática com o pH para ambas as espécies. O peso das larvas de *A. lacustris* sofreu efeito dos níveis de pH, apresentando maiores valores no tratamento com pH de 9,30 e menor no de 6,13 (Figura 6). As larvas de *P. mesopotamicus* também sofreram efeitos diferentes dos níveis de pH sobre a variável peso, sendo o maior observado no tratamento com pH de 8,30 e o no pH de 9,35 (Figura 6).

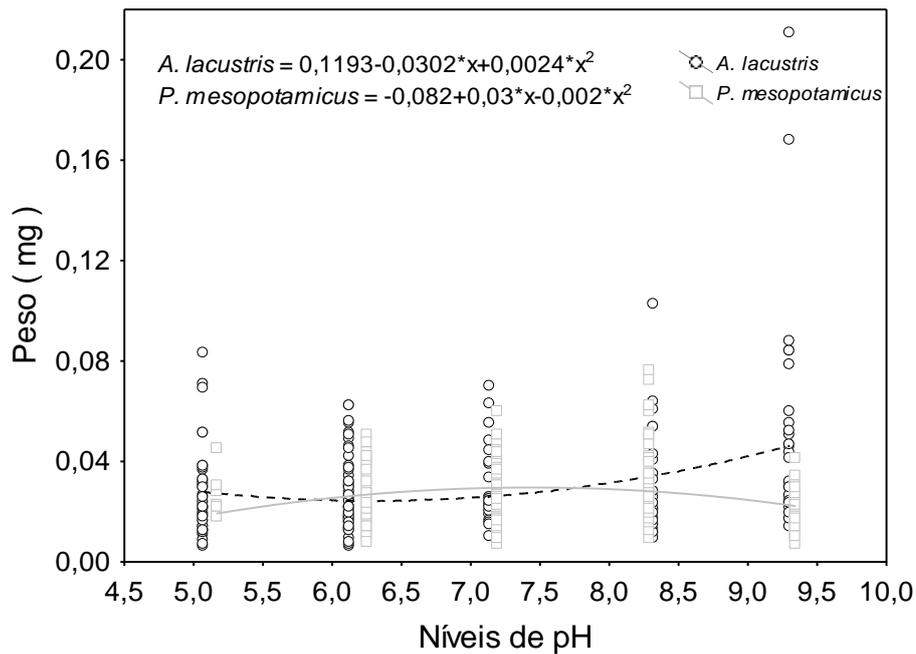


Figura 6. Análise de Covariância Multivariada (MANCOVA) aplicado ao peso das larvas de *Astyanax lacustris* e *Piaractus mesopotamicus* em função dos diferentes níveis de pH.

O comprimento total das larvas de *A. lacustris* também apresentou valores diferenciados entre os tratamentos, sendo os maiores no pH de 9,30 e os menores no de 5,08, e para as larvas de *P. mesopotamicus* os maiores valores foram no pH de 7,19 e menores no de 9,35 (Figura 7)

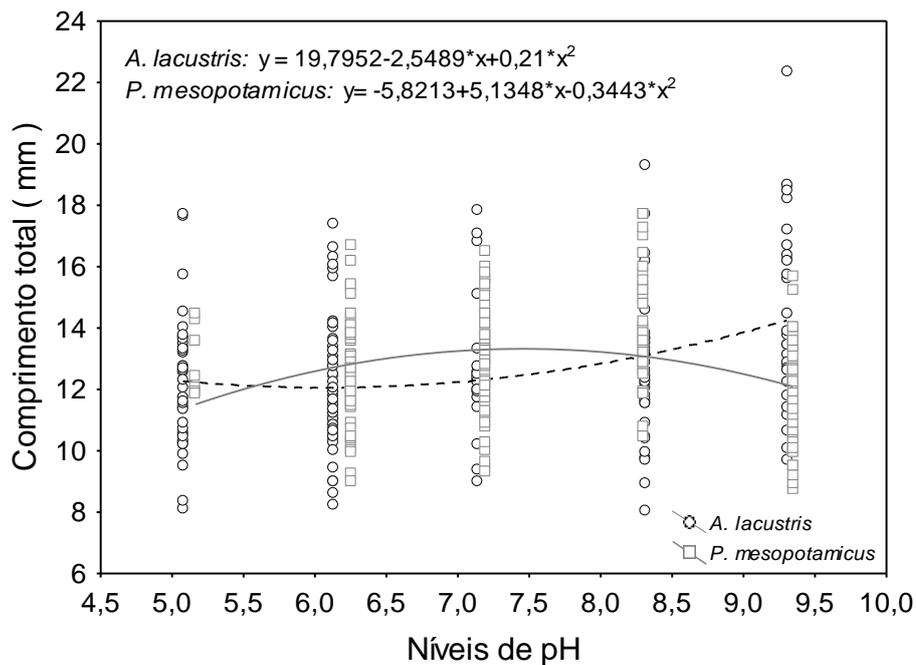


Figura 7. Análise Covariância Multivariada (MANCOVA) aplicado ao comprimento total das larvas de *Astyanax lacustris* e *Piaractus mesopotamicus* em função dos diferentes níveis de pH.

As larvas de *A. lacustris* sofreram efeito do pH nas variáveis: comprimento padrão (Figura 8A), comprimento da cabeça (Figura 8B), altura da cabeça (Figura 8C) e altura do corpo (Figura 8D), sendo para todas elas os maiores valores no pH de 9,30. Para as larvas de *P. mesopotamicus* esta variável sofreu influência nos pH de 8,30 (maiores) e de 9,35 (menores).

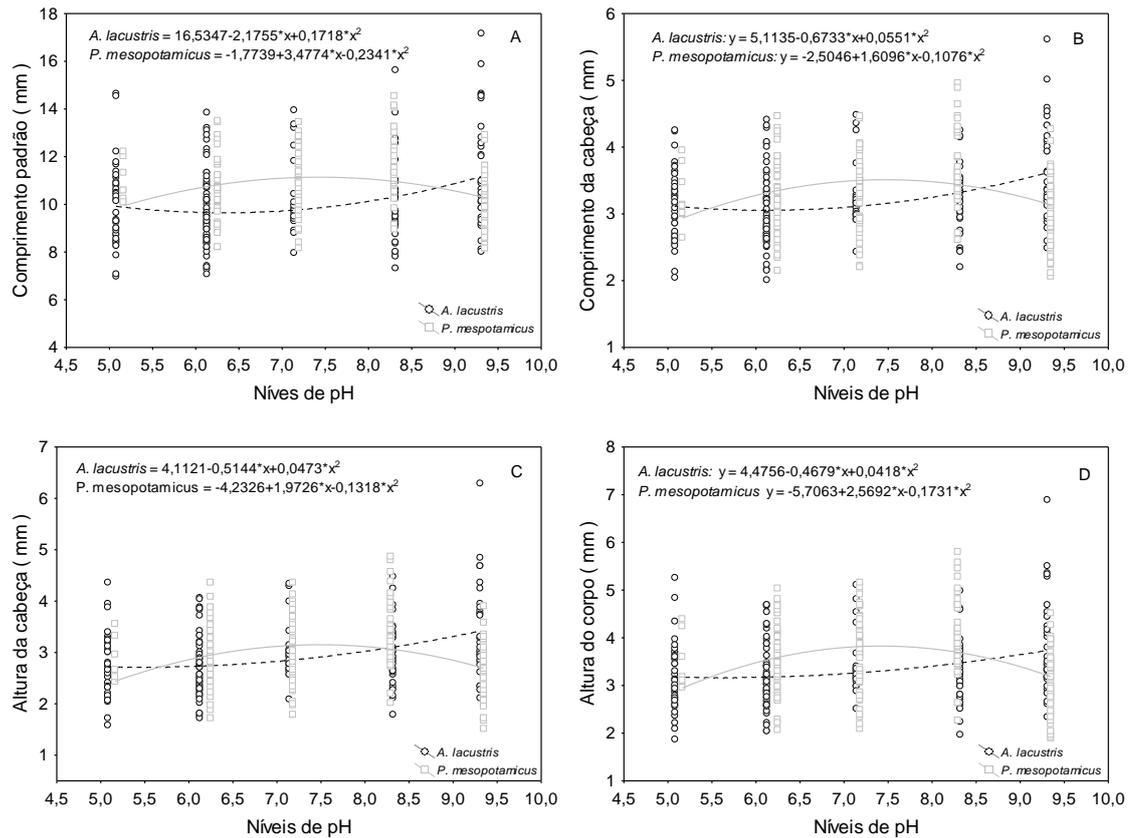


Figura 8. Análise Covariância Multivariada (MANCOVA) aplicado ao comprimento padrão (A), comprimento da cabeça (B), altura da cabeça (C) e altura do corpo (D) das larvas de *Astyanax lacustris* e *Piaractus mesopotamicus* em função dos diferentes níveis de pH.

4 DISCUSSÃO

Os períodos embrionário e larval dos peixes geralmente são considerados os mais sensíveis do ciclo de vida de um teleósteo, sendo particularmente susceptíveis a todos os tipos de alterações ambientais (Westernhagen, 1988). Neste estudo, os ensaios com incubação e larvicultura de *A. lacustris* e *P. mesopotamicus* revelaram uma influência importante e diferenciada da variável pH sobre a sobrevivência e o desenvolvimento destas espécies. *Astyanax lacustris* e *P. mesopotamicus* por pertencerem a guildas reprodutivas diferentes apresentam ovos morfologicamente distintos (Nakatani *et al.*, 2001). Porém, ao serem expostos a diferentes níveis de pH, estes não apresentaram influência no tempo de incubação. Segundo Blaxter (1988) o período de incubação está relacionado a temperatura da água e a quantidade de vitelo, assim é possível que ao manter a temperatura elevada (próxima aos 25 graus) houve uma aceleração do desenvolvimento, permitindo que os embriões não ficassem expostos por um tempo prologando aos diferentes níveis de pH e, conseqüentemente, não sofressem grandes danos (Sayer *et al.*, 1993). Isso porque as enzimas corionases e proteolíticas responsáveis pela eclosão, quando expostas por muito tempo em pH ácido são inativadas, aumentando a susceptibilidade a falhas no processo, podendo resultar em eclosão tardia (Hagenmaier, 1974; Daye & Garside, 1977, 1979; Johansson *et al.*, 1977; Peterson *et al.*, 1980; Sayer *et al.*, 1993).

A taxa de eclosão de *A. lacustris* não foi afetada pelos diferentes níveis de pH, ou seja, os ovos e embriões desta espécie conseguiriam se desenvolver em ambientes com diferentes níveis de pH. Em pH ácido (pH de 5,14 e 6,14), as taxas de eclosão de *A. lacustris* foram consideravelmente maiores do que as observadas em *P. mesopotamicus*, onde neste pH (5,14) ocorreu a mortalidade total dos ovos. Efeitos similares foram relatados para outras espécies de peixes migradores, como *Salmo fontinalis*, *Colossoma macropomum*, *Leporinus obtusidens*, e *Prochilodus lineatus*, em que a taxa de eclosão em pH ácido foram muito baixas ou quase nulas (Swarts *et al.*, 1978; Ascon, 2000; Gosmann, 2012; Reynalte-Tataje, 2015). Alguns autores reportam que o gênero *Astyanax* em geral apresenta alta resistência aos efeitos negativos dos ambientes, visto que possuem alta plasticidade ambiental, além de apresentar estratégia reprodutiva mais elaborada, com ovos pequenos e de rápido desenvolvimento (Dias *et al.*, 2005; Suzuki, 2009).

Os ovos inviáveis de *A. lacustris* não apresentaram deformidades, sendo identificado apenas o rompimento do vitelo e uma coloração esbranquiçada, diferentemente dos ovos de *P. mesopotamicus* onde o estresse ácido causou além do rompimento do vitelo e a coloração

esbranquiçada, também malformações no córion. *Piaractus mesopotamicus* possui ovos com um grande espaço perivitelino e elevada relação superfície-volume, desta forma, é possível que as malformações encontradas sejam decorrentes do efeito do pH ácido que altera fisiologicamente a osmorregulação dos coloides perivitelino e conseqüentemente, interrompe a captação de água pela membrana, diminuindo a resistência às deformações mecânicas (Eddy & Talbott, 1983; Mangor-Jensen, 1987; Westernhagen, 1988).

As larvas recém-eclodidas de ambas as espécies incubadas em baixos níveis de pH (5,14 para *A. lacustris* e 6,25 para *P. mesopotamicus*), apresentaram malformações esqueléticas no corpo, na cabeça e no vitelo. Além disso, foi possível observar uma relação positiva do comprimento total das larvas com o aumento dos níveis do pH no ensaio de *A. lacustris*. Esses resultados são corroborados na literatura, onde alguns autores reportam que tanto as malformações quanto a relação com o comprimento total são decorrentes dos níveis de pH neutro a alcalino que maximizam a absorção do íon Ca^{2+} aquoso, que é extremamente importante para o desenvolvimento esquelético das larvas. Resultado semelhante pode ser observado para outra espécie não migradora *Esox lucius*, que possui tamanhos maiores em pH neutro a alcalino (Johansson & Kihlstrom, 1975; Daye & Garside, 1980; Sadler & Lynam, 1989; Sayer *et al.*, 1991; Steingraeber & Gingerish, 1991).

Em relação a taxa de sobrevivência, não foi observada efeito do pH nas larvas de *A. lacustris*, por outro lado, para as de *P. mesopotamicus*, houve um aumento com o incremento dos níveis de pH. Com este resultado pode-se inferir que esta espécie apresenta dificuldade em se desenvolver com êxito em ambientes com pH ácido. Ademais, este comportamento inverso entre as larvas de *A. lacustris* e *P. mesopotamicus* pode ser explicada pelo fato das espécies migradoras, geralmente, realizarem suas desovas no canal principal ou em tributários adjacentes, onde o pH geralmente é neutro ou alcalino, como encontrado no rio Paraná (pH 7,1), rio Ivinheima (pH 7,0), rio Uruguai (pH 7,1) e rio Cuiabá (pH próximo a 6,8 até 9,3) (Agostinho *et al.*, 1993; Larenze & Arrigoni, 1993; Thomaz *et al.*, 1997; Ziober *et al.*, 2012). No entanto, cada espécie possui uma faixa ambiental ideal de crescimento, relacionada com sua história natural (Reynate-Tataje *et al.*, 2015). Assim como são relatados a sobrevivência de espécies de peixes em condições naturais com níveis extremos de pH (lagos da região Amazônica, pH 4,44 e lagoas do Pantanal Mato-Grossense, pH 11), provavelmente, por possuírem adaptações e estratégias reprodutivas diferenciadas para ocuparem ambientes nestas condições (Esteves, 1988; Krebs, 1994; Oliveira, *et al.*, 2008).

Os peixes necessitam de condições favoráveis para a reprodução e sobrevivência das fases iniciais de desenvolvimento, e conseqüente sucesso no recrutamento (Urho, 1999). No

entanto, o ambiente natural e suas características que representariam essas condições adequadas, vêm sendo alteradas pelos impactos diretos das atividades humanas, tais como os barramentos dos rios, canalização de riachos, escoamento agrícola para os corpos aquáticos, além da acidificação aquática pelas mudanças climáticas (Roland *et al.*, 2012). Tais mudanças nos ambientes aquáticos podem vir a causar efeitos deletérios para o desenvolvimento inicial de espécies, em especial às migradoras que possam ter características semelhantes a *P. mesopotamicus*, restringindo ainda mais suas áreas de reprodução.

Com este estudo podemos concluir que as fases de desenvolvimento embrionário e larval de espécies que realizam pequenas migrações e migradoras de longa distância apresentaram respostas diferentes em relação aos valores de pH estudados, sendo que as guildas reprodutivas semelhantes a de *A. lacustris* possuem maior tolerância ao pH mais ácido, enquanto as espécies migradoras como *P. mesopotamicus* apresentam melhor desenvolvimento com pH mais alcalino. Estes resultados evidenciam a importância dos estudos entre fatores abióticos e o desenvolvimento inicial dos peixes, os quais buscam compreender as relações entre estes organismos e o meio em que vivem.

REFERÊNCIAS

- Agostinho, AA., Vazzoler, MLAEA., Gomes, LC., Okada, EK., 1993. Estratificação espacial y comportamiento de *Prochilodus scrofa* em distintas fases del ciclo de vida, em la planície de inundación del alto rio Paraná y embalse de Itaipu, Paraná, Brasil. Rev. hydrobiol. Trop, 26, 79-90.
- Agostinho, AA., Gomes LC., Veríssimo, S., Okada, EK., 2004. Flood regime, dam regulation and fish in the Upper Paraná River: effects on assemblage attributes, reproduction and recruitment. Rev Fish Biol Fisher, 14, 11–19.
- Ahlstrom, EH., Moser, HG., 1976. Eggs and larvae of fishes and their role in systematic investigations and in fisheries. Rev. trav. Inst. pêches marit, 40 (3), 379-398.
- Ascon, GD., 2000. Efeito do pH, do cálcio e do oxigênio sobre a regulação iônica (Na^+ , K^+ e Ca^{+2}) na fase inicial do desenvolvimento embrionário do tambaqui, *Collossoma macropomum* Cuvier, 1818 (Pisces, Characiformes). Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 42p.

- Bagenal, TB., Braum, E., 1978. Eggs and early life history. in: Bagenal, T. (Ed.), *Methods of Assessment of Fish Production in Fresh Waters*. IBP Handbook 3, Blackwell Scientific, Oxford, pp.165-201.
- Blaxter, JHS., 1988. Pattern and variety in development. in: Hoar, WS., Randall, DJ. (Eds.), *Fish physiology*, v11: The physiology of developing fish. Pt. A. Eggs and larvae. San Diego: Academic Press, pp. 1-58.
- Baumgartner, G., Nakatani, K., Cavicchioli, M., Baumgartner, MST., 1997. Some aspects of the ecology of fish larvae in the floodplain of the high Paraná River, Brazil. *Rev. Bras. Zool*, 14, 551-563.
- Baumgartner, G., Nakatani, K., Gomes, LC., Bialezki, A., Sanches, PV., Makrakis, MC., 2008. Fish larvae from the upper Paraná River: Do abiotic factors affect larval density? *Neotrop. Ichthyol*, 6(4), 551-558.
- Bye, VJ., 1989. The role of environmental factors in the timing of reproductive cycles. In: Potts, G.W., Wootton, R.J. (Eds). *Fish reproduction: strategies and tactics*. London: Academic Press, pp. 187-205.
- Curiacos, AP., 1999. Efeito da temperatura no desenvolvimento inicial de larvas de curimatá *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Characiformes, Prochilodontidae). Dissertação de Mestrado em Aquicultura- Programa de Pós graduação em Aquicultura, centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.
- Daye, PG., Garside, ET., 1977. Lower lethal levels of pH for embryos and alevins of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Can. J. Zool*, 55, 1504-1508.
- Daye, EG., Garside, ET., 1980. Development and survival of embryos and alevins of the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. continuously exposed to acidic levels of pH, from fertilization. *Can. J. Zool*, 57, 1713-1718.
- Esteves, FA., 1988. *Fundamentos de Limnologia*, 1ª ed. Rio de Janeiro: Interciência- FINEP, 575p.
- Esteves, FA., 2011. *Fundamentos de Limnologia*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Interciência. 826p.

- Ferreira, AA., Nuñez, APO., Esquivel, JR., 2001. Influência do pH sobre ovos e larvas de jundiá, *Rhamdia quelen* (Osteichthyes, Siluriformes). *Acta Sci. Biol. Sci*, 23, 477-481.
- Gavaia, PJ., Dinis, MT., Cancela, ML., 2002. Osteological development and abnormalities of the vertebral column and caudal skeleton in larval and juvenile stages of hatchery-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, Amsterdam, 211(2), 305-323.
- Gazzola, AC., 2003. Efeito da amônia e do oxigênio dissolvido na sobrevivência de alevinos de dourado, *Salminus brasiliensis*. Dissertação de Mestrado em Aquicultura- Programa de Pós graduação em Aquicultura, centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 38p.
- Godinho, HP., 2007. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. *Rev. Bras. Reprod. Anim*, 31 (3), 351-360.
- Gosmann, MA., 2012. Incubação dos ovos e larvicultura de piava (*Leporinus obtusidens*): efeito do pH. Dissertação de Mestrado em Aquicultura- Programa de Pós graduação em Aquicultura, centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.
- Hagenmaier, HE., 1974. The hatching process in fish embryos. IV The enzymological properties of a highly purified enzyme (chorionase) from the hatching fluid of the rainbow trout (*Salmon gairdneri*, R.). *Comp. Biochem. Physiol*, 49 (B), 313-324.
- Ishimatsu, A., Hayashi, M., Kikkawa, T., 2008. Fishes in high CO₂, acidified oceans. *Mar. Ecol. Prog. Ser*, 373, 295–302.
- Johansson, N., Kihlstrom, JE., 1975. Pikes (*Esox lucius* L.) shown to be affected by low pH values during first weeks after hatching. *Environ. Res*, 9, 12-17.
- Johansson, DW., Webster, DA., 1977. Avoidance of low pH in selection of spawning sites by brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *J. Fish. Res. Bd Can*, 34, 2215-2218.
- Krebs, C.J, 1994, *Ecology: The experimental analysis of distribution and abundance*. New York: Harper Collins College Publishers, 801p.
- Kikkawa, T., Ishimatsu, A., Kita, J., 2003. Acute CO₂ tolerance during the early developmental stages of four marine teleosts. *Environ. Toxicol*, 18, 375–382.

- Kipper, D., 2015. A variabilidade hidrológica e sua influência sobre as formas iniciais de peixes em um rio situado numa bacia Neotropical. Tese de Doutorado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais - Universidade Estadual de Maringá, Dep. de Biologia, Maringá. 70p.
- Kitagawa, AT., 2012. Influência do fotoperíodo no crescimento do Pacamã. Dissertação de Mestrado em Ciências Animal, Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas. 42p.
- Korwin-Kossakowski, M., 1989. Larval development of carp, *Cyprinus carpio* L., in acidic water. J. Fish Biol, 32, 17-26.
- Larenze, G., Arrigoni, S., 1993. II Seminario de Calidad de Aguas y Control de la Contaminación del Rio Uruguay. Colon, Publicación de la Comisión Administrativa del Rio Uruguay. 40p.
- Lowe-McConnell, RH., 1987. Ecological Studies in Tropical Fish Communities. Cambridge: University Press.
- Munro, AD., 1990. General introduction. in: Munro, A.D., Scott, A.P., Lam, T.J. (Eds.) Reproductive seasonality in teleosts: Environmental influences. Florida: CRC Press.
- Nakatani, K., Baumgartner, G., Cavicchioli, M., 1997. Ecologia de ovos e larvas de peixes. in: Vazzoler, A.E.A de M., Agostinho, A.A., Hahn, N.S., (Eds.), A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos ecosocioeconômicos. Maringá: EDUEM, pp. 281–306.
- Nakatani, K., Agostinho, AA., Baumgartner, G., Bialecki, A., Sanches, PV., Makrakis, MC., Pavanelli, CS., 2001. Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação. Maringá, EDUEM, 349p.
- Oliveira, EC., Ferreira, EJG., 2008. Spawning areas, dispersion and microhabitats of fish larvae in the Anavilhanas Ecological Station, rio Negro, Amazonas State, Brazil. Neotrop. Ichthyol, 6(4), 559-566.
- Okamoto, M.H., 2004. Efeito da temperatura sobre ovos e larvas do linguado *Paralichthys orbignyanus*. Dissertação de Mestrado em Aquicultura – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

- Peterson, RH., Daye, PG., Metcalfe, JL., 1980. Inhibition of Atlantic salmon (*Salmo salar*) hatching at low pH. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 37, 770-74.
- Rebouças, PM., Lima, LR., Dias, IF., Filho, JADB., 2014. Influência da oscilação térmica na água da piscicultura. *J. Anim. Behav. Biometerol*, 2 (2), 35-42.
- Reynalte-Tataje, DA., Luz, RK., Meuer, S., Zaniboni-Filho, E., 2002. Influência do fotoperíodo no crescimento e sobrevivência de pós-larvas de Piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) (Osteichthyes, Characidae). *Acta Sci.* 24 (2), 439-443.
- Reynalte-Tataje, DA., Zaniboni-Filho, E., 2008. Biologia e identificação de ovos e larvas de peixes do alto rio Uruguai. Brasil. in: Zaniboni-Filho, E., Nuñez, APO. (Eds.), Reservatório de Itá. Estudos ambientais, desenvolvimento de tecnologias de cultivo e conservação da ictiofauna. Florianópolis: Editora UFSC, pp. 139-154.
- Reynalte-Tataje, DA., Baldisserotto, B., Zaniboni-Filho, E., 2015. The effect of water pH on the incubation and larvicultura of curimatá *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1837) (Characiformes: Prochilodontidae). *Neotrop. Ichthyol*, 13(1), 179-186.
- Roland, F., Huszar, VLM., Farjalla, VF., Enrich-Prast, A., Amado, AM., Ometto, JPHB., 2012. Climate change in Brazil: perspective on the biogeochemistry of inland waters. *Braz. J. Biol*, 72 (3), 709-722.
- Sadler, K., Lynam, S., 1989. Results of a second year's experiments concerning survival and development of some Norwegian strains of brow trout (*Salmo trutta*) when exposed to low pH and elevated aluminium concentrations. *National Power Technology and Environmental*, 21p.
- Sayer, MDJ., 1991. Survival and subsequent development of brow trout, *Salmo trutta* L., subjected to episodic exposures of acid, aluminium and copper in soft water during embryonic and larval stages, *J. Fish Biol*, 38, 969-72.
- Sayer, MDJ., Reader, JP., Dalziel, TRK., 1993. Freshwater acidification: effects on the early life stages of fish. *Rev. Fish Biol. Fisher*, 3, 95-132
- Scott, DM., Lucas, MC., Wilson, RW., 2005. The effect of high pH on ion balance, nitrogen excretion and behavior in freshwater fish from an eutrophic lake: a laboratory and field study. *Aquat. Toxicol*, 73, 31-43.

Steingraeber, MT., Gingerich, WH., 1991. Hatching, growth, ion accumulation, and skeletal ossification of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) alevins in acidic soft waters. *Can. J. Zool.*, 69: 2266-2276.

Suzuki, H.I., 1999. Estratégias reprodutivas de peixes relacionadas ao sucesso na colonização em dois reservatórios do rio Iguçu. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil.

Suzuki, HI., Pelicice, FM., Luiz, EA., Latini, JD., Agostinho, AA., 2004a. Estratégias reprodutivas da assembleia de peixes da planície de inundação do alto Rio Paraná. Reproductive strategies of the fish community of the Upper Paraná river floodplain. in: Angelo, A.A., Rodrigues, L, Gomes, LC, Thomaz, SM, Miranda, LE, (Eds.), Structure and functioning of the Paraná River and its floodplain. Maringá: EDUEM, 125-130.

Suzuki, HI., Vazzoler, AEAM., Marques, EE., Lizama, MAP., Inada, P., 2004. Reproductive ecology of the fish assemblages. in: Thomaz, SM, Agostinho, AA, Hahn, NS. (Eds.), The upper Paraná River and its floodplain: physical aspects, ecology and conservation. Leiden: Backhuys Publishers, pp. 271-291.

Suzuki, HI., Agostinho, AA., Bailly, D., Gimenes, MF., Julio-Junior, HF., Gomes, LC., 2009. Inter-annual variations in the abundance of young-of-the-year of migratory fishes in the Upper Paraná River floodplain: relations with hydrographic attributes. *Braz. J Biol*, 69(2): 649–660.

Swarts, F.A., Dunson, WA., Wright, JE., 1978. Genetic and environmental factors involved in increased resistance of brook trout to sulfuric acid solutions and mine acid polluted waters. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 107: 651-677.

Thomaz, SM., Roberto, MC., Bini, LM., 1997. Caracterização limnológica dos ambientes aquáticos e influência dos níveis fluviométricos. in: Vazzoler, AEAM., Agostinho, AA, Segatti, NH (Eds.), A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos. Maringá: EDUEM, pp. 73-102.

Urho, L., 1999. Relationship between dispersal of larvae and nursery areas in the Baltic Sea. *J Mar Sci*, 56: 114-121.

- Van Dijk, PLM., Thillart, GEEJ., Balm, P., 1993. Influence of gradual acid/base status and plasma hormone levels in carp (*Cyprinus carpio*). *J Fish Biol*, 42: 661–671.
- Vazzoler, AEAM., 1996. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: Teoria e prática*. Maringá: EDUEM, 169p.
- Vazzoler, AEAM., Lizama, MAP., Inada, P., 1997. Influências ambientais sobre a sazonalidade reprodutiva. in: Vazzoler, AEAM., Agostinho, AA., Hanhn, NS., (Eds.), *A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos*. Maringá: EDUEM, pp. 267-278.
- Zaniboni-Filho, E., Nuñez, APO., Reynalte-Tataje, DA., Serafini, RL., 2009. Water pH and *Prochilodus lineatus* larvae survival *Fish Physiol Biochem*, 35: 151-155.
- Ziober, SR., Bialecki, A., Mateus, LAF., 2012. Effect of abiotic variables on fish eggs and larvae distribution in headwaters of Cuiabá River, Mato Grosso State, Brazil. *Neotrop Ichthyol*, 10(1): 123-132.
- Zweig, RD., Morton JD., Stewart MM., 1999. *Source water quality for aquaculture*. World Bank, Washington.
- Weiss, L.A., 2007. *Influencia da amônia e do oxigênio dissolvido na sobrevivência dos juvenis diploides e triploides de jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard 1824)*. Florianópolis. Dissertação de Mestrado em Aquicultura- Programa de Pós-graduação em Aquicultura, centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, 45p.
- Welcomme, RL., 1979. *Fisheries ecology of floodplain rivers*. New York: Longman, 317p.
- Werner, RG., 2002. Habitat requirements. in: Fuiman, L.A., Werner, R.G., (Eds.), *Fishery Science The Unique Contributions of Early Life Stages*. Oxford: Blackwell Sciencies, pp. 161-182.
- Westernhagen, HV., 1988. Effects of pollutants on fish eggs and larvae. in: Hoar, WS., Randall, DJ (Eds.), *Fish Physiology*. v11: *The physiology of developing fish*. Pt, A. Eggs and larvae. San Diego: Academic Press, pp. 407-466.