



ALTERAÇÕES DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS EM TILÁPIAS MANTIDAS EM DIFERENTES SISTEMAS DE AQUÁRIOS EXPERIMENTAIS

Thais Adhmann de Lima¹; Silvio Cesar Russo Pimentel²; Victor Rossi Pinheiro³; Valery Alicia Assunção de Camargo⁴; Márcia Mayumi Ishikawa⁵

Nº 19411

RESUMO - O objetivo deste estudo foi avaliar as variáveis hematológicas de tilápias para obtenção de potenciais biomarcadores de peixes no monitoramento de qualidade da água dos sistemas de aquários experimentais. Avaliou-se as alterações na série vermelha em juvenis de tilápias mantidas durante 30 dias em sistema de aquários com volume útil de 300 L provenientes dos grupos controle de dois experimentos conduzidos no Laboratório de Ecossistemas Aquáticos da Embrapa Meio Ambiente. No experimento 1 utilizaram-se quatro tratamentos e três repetições em sistema sem recirculação. No experimento 2 utilizaram-se quatro tratamentos e cinco repetições em sistema com recirculação da água. Os parâmetros de monitoramento da água dos dois experimentos, como o pH, o oxigênio dissolvido, a temperatura e condutividade foram mensurados diariamente e apresentaram valores sem diferença significativa entre os dois experimentos. No entanto, o teor de amônia total foi mais alto no sistema sem recirculação da água. Desta forma, observou-se que os peixes mantidos no sistema com recirculação de água apresentam respostas hematológicas de acordo com o descrito na literatura e os peixes do sistema sem recirculação apresentam valores mais baixos de hemoglobina, hematócrito e eritrócitos. Alterações na série vermelha em juvenis de tilápias observadas nos experimentos avaliados neste trabalho indicam seu potencial como biomarcadores de qualidade da água.

Palavras-chaves: biomarcadores; amônia; monitoramento; qualidade da água

ABSTRACT – The aim of this study was to evaluate the hematological variables of tilapia to obtain potential biomarkers of fish in the monitoring of water quality of experimental aquarium systems. The changes in the red series in juveniles of tilapia kept for 30 days in a system of aquariums with a useful volume of 300 L from the control groups of two experiments conducted at the Laboratory of Aquatic Ecosystems of Embrapa Environment were evaluated. In experiment 1, four treatments and

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Medicina veterinária, UNIFAJ, Jaguariúna-SP; thaisadhmann@outlook.com

2 Estagiário Embrapa: Graduação em Medicina Veterinária, UNIFAJ, Jaguariúna-SP.

3 Bolsista Embrapa: Graduação em Medicina Veterinária, UNIFAJ, Jaguariúna-SP.

4 Bolsista Embrapa: Graduação em Ciências Biológicas, PUC, Campinas-SP.

5 Orientador: Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; marcia.ishikawa@embrapa.br



three replications were used in a system without recirculation. In experiment 2, four treatments and five replications were used in a system with water recirculation. The water monitoring parameters of the two experiments, such as pH, dissolved oxygen, temperature and conductivity were measured daily and presented values with no significant difference between the two experiments. However, total ammonia content was higher in the system without water recirculation. Thus, it was observed that the fish kept in the system with water recirculation present hematological responses as described in the literature and the fish of the system without recirculation present lower values of hemoglobin, hematocrit and erythrocytes. Changes in the red series in tilapias observed in the experiments evaluated in this work indicate their potential as biomarkers of water quality.

Keywords: biomarkers; ammonia; monitoring; water quality.

1 INTRODUÇÃO

Um método de auxílio bastante adotado como de monitoramento de qualidade da água é a utilização de bioindicadores e biomarcadores. Os bioindicadores são espécies vegetais e animais que expressam os sintomas iniciais de estresse ambiental através do efeito de contaminantes. Biomarcadores nada mais são que a expressão de alterações na homeostasia animal com resposta biológica, seja em nível bioquímico, molecular e/ou celular, com relação aos efeitos toxicológicos de substâncias químicas (ADAMS, 2002; VAN DER OOST *et al.*, 2003).

A utilização de peixes para a avaliação de níveis de toxicidade é de grande relevância por estarem presentes em diversos ambientes com ampla distribuição geográfica e com diferentes coeficientes tróficos da cadeia alimentar (JESUS; CARVALHO, 2008), sendo um importante instrumento para a avaliação de qualidade da água, usados como modelos de estudos biológicos (BUSS *et al.*, 2003).

Diversas causas estão envolvidas na avaliação de qualidade da água, exigindo assim a execução de estudos aprofundados dos processos químicos, físicos e biológicos que podem ocorrer em sistemas artificiais, assim como em ambiente natural, realçando-se a importância da compreensão dos ciclos biogeoquímicos em ecossistema aquático (CARMOUZE, 1994).

Em meio aquático, os componentes relacionados com a qualidade deste ecossistema são os compostos nitrogenados, encontrados em diferentes formas como nitrito, nitrato, amônia, óxido nítrico e amoníaco. O principal composto nitrogenado excretado pelos peixes é a amônia, podendo afetar diretamente a fauna do ambiente em questão, seja natural ou artificial. Assim, é de grande



relevância a realização do controle dos resíduos nitrogenados dentro dos níveis seguros e de acordo com os parâmetros para cada espécie de peixes (HILLABY; RANDALL, 1979).

Desta forma, se faz necessário o acompanhamento dos fatores que contribuem com a determinação da qualidade, como a temperatura, oxigênio dissolvido, pH, transparência, alcalinidade e concentração de resíduos metabólicos como a amônia (PEREIRA; MERCANTE, 2018).

A decomposição da matéria orgânica, aeróbica e anaeróbica, resultará na formação e eliminação de resíduos metabólicos, por exemplo, a amônia. A ocorrência de oxidação da amônia para nitrato é nomeada de nitrificação, onde o íon amônio (NH_4^+) irá doar hidrogênio através da ação de microrganismos que contribuirão no processo de síntese. Os microrganismos envolvidos neste processo são da família das bactérias nitrificantes, as Nitrobacteriaceae, de apresentação gram-negativas, dos gêneros *Nitrossomonas* e *Nitrobacter* (PEREIRA; MERCANTE, 2018).

Após o processo de fixação, seguida pela amonificação (formação da amônia), ao qual é realizado por bactérias e fungos através de compostos excretores e resíduos de matéria orgânica, ocorrendo anaerobicamente, dá-se início a nitrificação. O processo de nitrificação é realizado antes da desnitrificação, utilizando o oxigênio disponível no meio. A nitrificação irá oxidar a amônia obtendo nitrato como produto. Primeiramente, as *Nitrossomonas* oxidam a amônia em nitrito e as *Nitrobacter* oxidam nitrito em nitrato, dependentes de oxigênio dissolvido (OD), sendo aeróbias obrigatórias. Já a desnitrificação irá metabolizar nitrato em gás nitrogênio (N_2), em respiração anaeróbia por bactérias *Pseudomonas*, metabolizando nitrato em nitrogênio gasoso liberado para a atmosfera dando início, novamente, ao processo de fixação (MARTINEZ *et al.*, 2006).

Os compostos resultantes deste processo, amônia e nitrito, são altamente tóxicos para os peixes, independente do seu nível no meio; já o nitrato se tornará tóxico especificamente em altas concentrações, principalmente em sistema fechado de recirculação de água onde pode atingir altos níveis devido a processo de nitrificação da amônia. Deste modo, em sistema fechado se faz necessária a utilização de filtros biológicos contendo bactérias nitrificantes, ao contrário no sistema de amplo fluxo não é de grande preocupação, devido à rápida retirada destes compostos, impedindo seu acúmulo (BALDISSEROTO, 2002; ARANA, 1997).

Em sistemas mal manejados, no entanto, este resíduo pode atingir altas concentrações, tóxicas rapidamente, levando à redução do crescimento, sobrevivência ou até causando a morte dos animais (URBINATI; CARNEIRO, 2004).

A representação da amônia através da conversão se dá de duas formas químicas, no qual a amônia não ionizada é NH_3 e a forma ionizada é NH_4^+ (íon amônio). A amônia total é caracterizada



pela soma de ambas, presentes em soluções aquosas. Suas concentrações são dependentes dos níveis de pH, temperatura e salinidade (menor relevância). A amônia não ionizada (NH_3) eleva-se com o aumento do pH (alcalino) e temperatura, reduzindo com o aumento da salinidade (BOWER; BIDWELL, 1978). Em sistema de produção, a maior causa de amônia no meio é decorrente da alimentação e sua toxicidade eleva-se no período final da tarde, devido ao aumento do pH e temperatura e redução da concentração de gás carbônico neste momento, podendo atingir seus níveis mais críticos neste período. O NH_4^+ é convertido através de hidratação em meio ácido ou neutro (BOYD, 1990).

Amônia em altas concentrações influencia na dinâmica do oxigênio dissolvido (OD) no meio. Em pH básico, NH_4^+ irá ser convertido em NH_3 , gerando toxicidade ao organismo do peixe (TRUSSEL, 1972).

Em concentrações acima de $0,20 \text{ mg L}^{-1}$, a amônia já é capaz de provocar toxicidade crônica e reduzir o processo de desenvolvimento (crescimento) do animal. Já em níveis entre $0,70$ e $2,40 \text{ mg L}^{-1}$ pode ser considerado letal para os peixes, mesmo em curto período. Em valores superiores a $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ pode provocar intensa inflamação e irritação das brânquias (KUBITZA, 1999).

Sendo assim, a amônia compõe o principal produto de excreção do nitrogênio em peixes, produzida através do catabolismo de proteínas, sobretudo no fígado. A fim de evitar uma bioacumulação, deve-se eliminar o quanto antes para não atingir níveis de toxicidade no organismo. Este composto é eliminado pelas brânquias, com colaboração de 2% pelo rim da excreção de amônia total (MARTINEZ *et al.*, 2006).

O objetivo deste estudo foi avaliar as variáveis hematológicas em tilápias para obtenção de potenciais biomarcadores de peixes no monitoramento de qualidade da água dos sistemas de aquários experimentais

2 MATERIAL E MÉTODOS

Na realização deste estudo utilizaram-se peixes de dois experimentos que foram conduzidos no Sistema de 32 Aquários com capacidade útil de 300 L do Laboratório de Ecossistemas Aquáticos da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP. Foram utilizados 15 juvenis de tilápias do grupo controle do experimento 1 e dez juvenis de tilápias do experimento 2. As tilápias foram provenientes de um produtor de Mogi-Mirim. Os experimentos foram realizados no período de setembro à novembro de 2018, sendo executados ao mesmo tempo, mas de forma independente. O experimento 1 foi conduzido em 12 aquários sem recirculação de água (Figura 1)

e renovação parcial da água. O experimento 2 foi conduzido em 20 aquários com recirculação de água (Figura 2). Os dois experimentos pertencem a dois projetos diferentes aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA (Embrapa Meio Ambiente) Protocolo nº 004/2016 e Protocolo nº 009/2048. No experimento 1 utilizaram-se 12 peixes por aquário, sendo quatro tratamentos e três repetições. No experimento 2 utilizaram-se 12 peixes por aquário, sendo quatro tratamentos e cinco repetições. Neste trabalho avaliaram-se os peixes do grupo controle de cada experimento.



Figura1-Sistema de Aquários do Experimento 1 sem recirculação de água

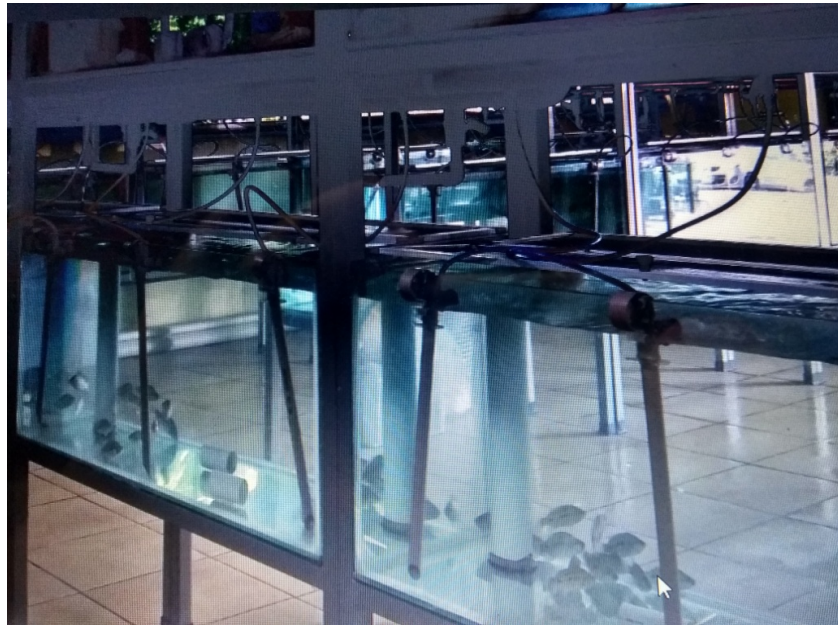


Figura 2- Sistema de Aquários do Experimento 2 com recirculação de água

Monitoramento de qualidade da água

A qualidade da água foi monitorada diariamente no período da manhã antes dos peixes serem alimentados com auxílio da sonda multiparâmetro (U-50, Horiba, Minami-ku, Kyoto, Japan). Mensurou-se a temperatura ($^{\circ}\text{C}$), o pH, o oxigênio dissolvido (mg L^{-1}) e a condutividade elétrica (μScm^{-1}). A amônia foi mensurada semanalmente com uso do kit da Labcon test.

Análise hematológica

Após o período experimental, 15 peixes do grupo controle do experimento 1 e dez peixes do experimento 2 foram anestesiados com benzocaína 100 mg L^{-1} (banho de imersão) para coleta de sangue por punção caudal, com auxílio de seringas contendo EDTA (3%).

O hematócrito (Htc%) foi determinado pelo método do microhematócrito e centrifugado em centrífuga modelo NI 1807 (Nova Instruments, Piracicaba, SP, Brasil) por 5 min e 10.000 rpm. As análises de hemoglobina (Hb; g dL^{-1}) foram realizadas pelo método do cianeto de hemoglobina (HCN) com Kit da Labtest Diagnóstica (LabtestDiagnóstica, MG, Brasil). O número total de eritrócitos foi determinado pelo método do hemocitômetro, em câmara de Neubauer. Após a coleta do sangue, os animais foram eutanasiados por aprofundamento com anestésico benzocaína a 150 mg L^{-1} (banho de imersão).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros mensurados no monitoramento de qualidade da água dos experimentos 1 e 2 estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros de qualidade da água dos experimentos 1 e 2.

Parâmetros	Experimento 1 e Experimento 2	
Temperatura (°C)	25,90±0,23 ^a	25,00±0,89 ^a
Condutividade (µScm ⁻¹)	0,199±0,01 ^a	0,197±0,01 ^a
pH	6,79±0,02 ^a	7,20±0,22 ^a
Oxigênio Dissolvido (mg L ⁻¹)	5,67±0,09 ^a	6,10±0,70 ^a
Amônia Total (ppm)	1,64±1,30 ^a	0,16±0,10 ^b

Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem pelo teste de Tukey (P < 0,05).

A amônia total do experimento 1 manteve valores médios de 1,64 ppm, mas apresentou um desvio padrão alto, ou seja, durante duas semanas a amônia alcançou concentrações de 3,5 ppm. Este desvio ocorre pelo fato de a manutenção da concentração de amônia ser feito por filtro biológico e o sistema não possuir recirculação de água, o que favoreceu a flutuação observada na concentração. No Experimento 2 a média da amônia manteve valores abaixo de 0,5 ppm e o desvio padrão foi baixo. Observou-se que dos parâmetros de qualidade da água dos dois experimentos analisados apenas a concentração de amônia apresentou diferença significativa, sendo um parâmetro limitante na produção intensiva e que exige monitoramento para garantir produtividade e saúde dos peixes.

Os resultados dos parâmetros hematológicos dos experimentos 1 e 2 estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Variáveis sanguíneas dos juvenis de tilápia em condições ambientais experimentais com e sem recirculação de água.

Parâmetros	Experimento 1 e Experimento 2	
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	11,68±4,00	14,22±2,02
Hematócrito (%)	27,3±8,67	30,50±14,09
Eritrócitos (x10 ⁶ L)	1,36±0,61	1,69±0,39
PPT (g L ⁻¹) *	4,8±0,44	4,34±0,75

* Proteína Plasmática Total

Nos peixes do Experimento 1, onde a concentração de amônia foi mais elevada, observaram-se valores mais baixos de hemoglobina, hematócrito e eritrócitos em relação aos



peixes do Experimento 2. Esta observação sugere uma diminuição na capacidade de compensação respiratória em decorrência do estresse ocasionado pelo aumento da amônia tóxica no ambiente. Outra hipótese provável seria devido à perda de eritrócitos decorrente de injúrias causadas pela amônia tóxica. De acordo com Pereira e Mercante (2018), a exposição crônica a amônia tóxica em concentrações acima de $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ podem ocasionar intensa irritação e inflamação nas brânquias. Estas reações podem influenciar nas alterações hematológicas. Estudo mais aprofundado deverá ser realizado sobre as alterações na saúde, resposta fisiológica, hematológica e de brânquias que a exposição à amônia tóxica em doses subletais possam ocasionar nos peixes, especialmente para avaliar a resposta hematológica de tilápias submetidas às concentrações de amônia acima de 3,5 ppm.

Peixes em concentrações subletais de amônia no meio favorecem as alterações fisiológicas, bioquímicas, histológicas e comportamental, podendo acarretar na diminuição do crescimento e comprometimento imunológico (HARGREAVES; KUCUK, 2001). Diversos parâmetros auxiliam na mensuração dos efeitos no organismo do animal, sendo os mais utilizados o hematócrito, hemoglobina, atividade enzimática relacionadas ao processo de detoxificação e degeneração branquial (MARTINEZ *et al.*, 2006).

A amônia também pode levar à resposta de estresse, onde irá alterar as respostas endócrinas. Essa variação pode gerar um conjunto de alterações de caráter primário, secundário e terciário, envolvendo níveis superiores da biologia e fisiologia, partindo do início de sintomas do SNC (sistema nervoso central) e endócrino, finalizando com alterações de modo geral (URBINATI; CARNEIRO, 2004). Este estresse endócrino apresenta dois tipos de resposta: a via eixo-hipotalâmico e células interrenais, elevando o cortisol no plasma e a resposta adrenérgica, quando há elevação de catecolaminas plasmáticas (BROWN, 1993).

A caracterização dos efeitos de estresse primário se dá pela resposta de hipersecreção de catecolaminas e corticosteróides. O cortisol e as catecolaminas provocam a ação de alterações fisiológicas e bioquímicas, denominadas de respostas secundárias. Já os efeitos metabólicos incluem-se hipoglicemia, redução das reservas teciduais de glicogênio, lipólise e síntese proteica inibida (JOBILING, 1994; THOMAS, 1990; WENDELAAR BONGA, 1997).

A exposição a concentrações subletais ou letais de amônia também pode provocar alterações histológicas em alguns tecidos e órgãos de peixes, com os danos em brânquias (ARANA, 1997). Tilápias jovens em meio com elevadas concentrações de amônia, no período de 24h, exibiram hiperplasia do epitélio branquial e fusão das lamelas (KARASU BENLI; KOKSAL, 2005).



Geralmente, as brânquias são as primeiras a demonstrarem alterações, devido a sua ação multifuncional e a área de interação entre o ambiente e o animal, onde ocorrerá a purificação de contaminantes. Desta forma, por ser o órgão fundamental para a realização da respiração, seu comprometimento afetará diretamente a ação de trocas gasosas e osmorregulação. Logo, a execução de exames histológicos, juntamente com outros parâmetros analisados, auxilia na determinação da atividade de determinados compostos químicos, como a amônia (MARTINEZ *et al.*, 2006). Os resultados deste trabalho corroboram para futuros estudos com concentrações de amônia e sugere a importância de estudos onde se possa avaliar e validar alterações hematológicas, fisiológicas e histopatológicas como biomarcadores de qualidade ambiental.

4 CONCLUSÃO

A exposição crônica de tilápias a concentrações subletais de amônia tóxica na água pode ocasionar respostas fisiológicas, hematológicas e de brânquias. . Alterações na série vermelha em juvenis de tilápias observadas nos experimentos avaliados neste trabalho indicam seu potencial como biomarcadores de qualidade da água.

5 AGRADECIMENTOS

À doutoranda Michelly Pereira Soares pelo auxílio na manutenção dos experimentos e por contribuir com parte dos dados dos peixes controle de seu experimento. Ao projeto BRS Aqua pelo apoio financeiro e ao CNPq pela Bolsa concedida.

5 REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. **Biological indicators of aquatic ecosystem stress**. American Fisheries Society, Maryland, USA. 2002. 656 p.
- ARANA, L. V. **Princípios químicos de qualidade da água em aquicultura: uma revisão para peixes e camarões**. Editora da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 1997. 166 p.
- BALDISSEROTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Editora da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2002. 212 p
- BOWER, C. E.; BIDWELL, J. P. Ionization of ammonia in seawater: effects of temperature, pH, and salinity. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, Toronto, v. 25, p. 1012-1016, 1978.
- BOYD, C. E. **Water quality in ponds for aquaculture**. International Center for Aquaculture, Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, AL, 1990. 482 p.



- BROWN, J. A. Endocrine response to environmental pollutants. *In*: RANKIN, J. C.; JENSEN, F. B. (ed.). **Fish ecophysiology**. Londres: Chapman & Hall, 1993. P. 276-296.
- BUSS, D.F.; BAPTISTA, D.F.; NESSIMIAN, J.L Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.19, p. 465-473, 2003.
- CARMOUZE, J.P. **O metabolismo dos ecossistemas aquáticos**. São Paulo: Edgard Blücher; Fapesp, 1994. 253p.
- HILLABY, B. A.; RANDALL, D. J. Acute ammonia toxicity and ammonia excretion in rainbow trout, (*Salmo gairdneri*). **Journal of the Fisheries Research Board of Canadá**, Toronto, v. 36, n. 6, p. 621-629, 1979.
- JESUS, T.B.; CARVALHO, C.E.V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v.12, p.680-693, 2008.
- JOBLING, M. **Fish bioenergetics**. Londres: Chapman & Hall, 1994. 294 p.
- KARASU BENLI, A.C.; KÖKSAL, G. The acute toxicity of ammonia on tilapia (*Oreochromis niloticus*L.) larvae and fingerlings. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, Ankara, v. 29, p. 339-344, 2005.
- KUBITZA, F. **Qualidade da água na produção de peixes**. 3. ed. Jundiaí: Degaspari, 1999. 97 p.
- MARTINEZ, C. B. R., F. AZEVEDO; E. U. WINKALER. Toxicidade e efeitos da amônia em peixes neotropicais. *In*: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C. **Tópicos especiais em biologia aquática e Aquicultura**. Jaboticabal: Aquabio, 2006. p. 81-95.
- PEREIRA, L.; MERCANTE, C. A amônia nos sistemas de criação de peixes e seus efeitos sobre a qualidade da água. Uma revisão. **Pesca Institute Buletin**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 81-88, 2018.
- THOMAS, P. Molecular and biochemical responses of fish to stressors and their potential use in environmental monitoring. *In*: ADAMS, S.M. Biological indicators of stress in fish. **American Fisheries Society**, Maryland, p. 9-28, 1990.
- URBINATI, E. C.; CARNEIRO, P. C. F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. *In*: CYRINO, J. E. P. *et al.* **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2004, p. 171-193.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 13, p. 57-149, 2003.
- WENDELAAR BONGA, S. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, Rockville – EUA. v. 77, p. 591-625, 1997.