INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE ÁGUA DOCE E PESCA INTERIOR – PPG BADPI

O efeito de poluentes urbanos nos padrões de descarga de *Microsternarchus* sp. (Gymnotiformes).

Dalton Moreira Nunes Filho

Manaus, Amazonas
Novembro, 2016

Dalton Moreira Nunes Filho

O efeito de poluentes urbanos nos padrões de descarga de *Microsternarchus* sp. (Gymnotiformes).

Orientador: Dr. José Antônio Alves Gomes
Coorientador: Dr. Jansen Alfredo Sampaio Zuanon

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do INPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

Manaus, Amazonas
Novembro, 2016

Ficha catalográfica

N972 Nunes Filho, Dalton Moreira

O efeito de poluentes urbanos nos padrões de descarga de *Microsternarchus* sp. (Gymnotiformes). /. Dalton Moreira Nunes Filho --- Manaus: [s.n.], 2016.
ix,40 f.: il.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2016.
Orientador: José Antônio Alves Gomes
Coorientador: Jansen Zuanon
Área de concentração: Biologia de Água Doce e Pesca Interior

1. Peixe elétrico. 2.Poluentes urbanos. 3. Fisiologia. I. Título.

CDD 597.5

Sinopse:

Estudou-se o efeito de diferentes concentrações da água poluída proveniente de um igarapé da cidade de Manaus sobre as variações biofísicas do padrão de descarga do órgão elétrico de *Microsternarchus* sp.. É discutida a possiblidade do uso de peixes gymnotiformes como biomonitores de qualidade da água de igarapés poluídos por efluentes urbanos.

Palavras-chave: peixe elétrico, órgão elétrico, fisiologia, parâmetros físico-químicos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e irmãos pela ajuda psicológica e financeira em todos momentos da minha vida.

Ao meu orientador, Dr. José Antônio Alves Gomes, que me proporcionou o primeiro contato com a Amazônia, com o INPA e com os “sarapós”. Parceiro de música, de ciência e da vida.

Ao meu coorientador Dr. Jansen Zuanon pela gentileza e jeito “macio” de tratar dos problemas. Um grande pesquisador/orientador e um ser humano fantástico.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Comportamental e Evolução (LFCE), minha primeira casa em Manaus. Obrigado gente, aprendi muito com vocês.

Aos colegas Diana, Valesca e Petersen também do LFCE que ajudaram bastante na minha “aclimatação” à Amazônia.

Aos meus colegas da turma 2014 do mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior do INPA pelos momentos juntos, aprendizados compartilhados e aflições repartidas. Agradecimento especial aos colegas Talles, Jojô e Natalinha.

Ao Dr. Sávio Ferreira do Laboratório de Química Ambiental do INPA pela ajuda logística, auxilio com as análises físico-químicas das águas e ensinamentos sobre poluição urbana em Manaus.

Ao Serviço Geológico do Brasil – CPRM pelo auxílio com as análises de nitrito, nitrato e amônio.

Ao corpo docente do BADPI, por me introduzir ao incrível mundo das águas e dos peixes amazônicos.

A Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pela oportunidade de trabalhar na Amazônia.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Sumário

Lista de figuras vi

Resumo..... viii

Abstract……. ix

1. Introdução 1

2. Objetivos 8

2.1 Objetivo geral: 8

2.2. Objetivos específicos: 9

3. Material e métodos 9

3.1. Coleta e manutenção dos peixes para os experimentos 9

3.2. Coleta da água poluída e diluições testadas 11

3.3. Experimentos 14

3.4. Análise de dados 18

4. Resultados 20

4.1. Análise dos parâmetros físico-químicos da água 20

4.2. Efeitos da água poluída nas DOEs de *Microsternarchus* sp. 21

5. Discussão 26

6. Conclusões 30

6. Referências bibliográficas 32

7. Anexos 38

Variação de frequência (Hz) diurno de *Microsternachus* sp. 38

Análise molecular 38

Lista de figuras

Figura 1. Exemplos de DOEs dos tipos pulso e onda. Os gráficos de Amplitude (Volts) x Tempo (milissegundos) mostram a variação da descarga ao longo do tempo, conforme visto na tela de um osciloscópio. (A) DOE tipo pulso do peixe *Microsternarchus* (linhagem C), a duração da descarga é menor que o intervalo entre duas descargas. (B) DOE tipo onda do peixe *Parapteronotus hasemani*, neste caso, a duração da descarga é maior ou igual ao intervalo entre duas descargas. Adaptado de Petersen (2013). 5

Figura 2. Localização da Reserva Ducke na região nordeste do município de Manaus, AM, com a indicação do igarapé onde os indivíduos de *Microsternarchus* sp. foram coletados para o estudo. 10

Figura 3. Vista área de Manaus (esquerda), com detalhe da localização do ponto de coleta da água poluída no igarapé Matrinxã.....12

Figura 4. Arranjo das condições experimentais de gravação das DOEs de indivíduos de *Microsternarchus* sp.: (1) aquário, (2) eletrodos, (3) amplificador, (4) osciloscópio, (5) conversor analógico/digital, (6) computador, (7) balde e (8) Caixa de Faraday…15

Figura 5. Fotografia de indivíduo de *Microsternarchus* sp., realizada ao término de um dos experimentos. A escala posicionada acima do peixe contém um código individual de identificação. 18

Figura 6. Representação gráfica das variações na frequência das DOEs (em Hertz, valores normalizados), mensuradas a cada meia hora ao longo de um período de cinco horas. Controle indica as frequências mensuradas em aquário contendo água padrão (não poluída), e os valores de porcentagem indicam as diferentes concentrações de água poluída nos tratamentos experimentais. (*) P<0,05). 22

Figura 7. Representação gráfica das variações de PPrel das DOEs (valores normalizados), mensuradas a cada meia hora ao longo de um período de cinco horas. Controle indica os resultados de PP rel mensurados em um aquário contendo

água padrão (não poluída), e os valores de porcentagem indicam as diferentes concentrações de água poluída nos tratamentos experimentais.....23

Figura 8. Representação gráfica das variações de PPF das DOEs (valores normalizados), mensuradas a cada meia hora ao longo de um período de cinco horas. Controle indica os resultados de PPF mensurados em um aquário contendo água padrão (não poluída), e os valores de porcentagem indicam as diferentes concentrações de água poluída nos tratamentos experimentais.....24

Figura 9. Representação gráfica das variações no P/S ratio (valores normalizados), mensuradas a cada meia hora ao longo de um período de cinco horas. Controle indica os resultados de P/S ratio mensurados em um aquário contendo água padrão (não poluída), e os valores de porcentagem indicam as diferentes concentrações de água poluída nos tratamentos experimentais.....25

Figura 10. Box splot das observações (agrupadas em pares) dos experimentos de 12 horas realizados sem período de aclimatação e sem manipulação experimental. 38

Figura 11. Árvore simplificada da família *Hypopomidae* (Arquivos LFCE). 39

Figura 12. Imagem comparativa entre DOEs de *Microsternachus*. As DOEs que apresentam fase negativa menor são dos peixes que foram os utilizados neste trabalho. O grupo que apresenta fases positiva e negativa de tamanho aproximado são descargas dos peixes utilizados por Petersen (Arquivos LFCE). 40

Resumo

A ordem Gymnotiformes abriga peixes endêmicos da região Neotropical, que dentre outras peculiaridades possuem a capacidade de gerar e detectar correntes elétricas através de um sistema que engloba células eletrogênicas e eletrorreceptoras, respectivamente. Através deste sistema estes peixes são capazes de se comunicar e se localizar em diversos tipos de ambientes, inclusive os que apresentam baixa luminosidade. Diversos estudos têm demonstrado que estes peixes tem um potencial de utilização como biomonitores ambientais, uma vez que os padrões de descarga do órgão elétrico se modificam dependendo da qualidade da água circundante. Este estudo teve como objetivo analisar o efeito da água poluída de um igarapé urbano de Manaus nos padrões de descarga de *Microsternarchus* sp. Foram realizados experimentos utilizando três concentrações de água poluída, além do tratamento controle. Os experimentos tiveram duração total de sete horas, divididas em duas horas de aclimatação, uma hora de pré-teste e quatro horas de exposição à água poluída. Os padrões de descarga foram monitorados em intervalos de 15 minutos, e cada gravação (observação) teve duração de cinco segundos. A análise dos parâmetros físico-químicos da água utilizada nos experimentos demonstrou que o igarapé estudado (Matrinxã) está severamente afetado pela poluição urbana. Os peixes apresentaram variações significativas e dose-dependentes na frequência de descarga, ao longo do período de exposição. O tratamento com nível mais alto de poluição provocou uma modificação detectável nos padrões da descarga do órgão elétrico (DOE) após duas horas e meia. O gênero *Microsternarchus* se mostrou um bom modelo para testes de biomonitoramento.

Abstract

The order Gymnotiformes is endemic of the Neotropical region and has, among other peculiarities, the capacity to generate and detect alternate electric currents, with an aid of a system that encompasses both electrogenic and electroreceptor cells, respectively. By means of this electrogenic and electrosensory system, these fish are able to communicate and to electrolocate in several types of habitats, including under the absence of light. Several studies have demonstrated the potential use of these fish as environmental biomonitors, once the patterns of the electric organ discharge may change, depending upon the physic-chemical properties of the surrounding water. This study had as objective to analyze the effect of polluted water from an urban stream of Manaus in the discharge patterns of *Microsternarchus* sp. Three concentration of pollution were used, beyond the control treatment. The experiments lasted seven hours, divided into two hours of acclimation, one hour of pre-test and four hours of exposition to the polluted water. The discharge patterns were monitored at 15 minutes intervals, and each observation (recording of the discharge) lasted five seconds. The results indicate that the stream studied (Matrinxã) is severely affected by urban pollution. The fish show significant and dose-dependent variation in their discharge patterns during the exposition time. The treatment with the highest concentration pollution level provoked a detectable change in the discharge pattern within two and half hours of exposition. The genus *Microsternarchus* appears as a good model for biomonitoring tests.

1. Introdução

Atualmente, cerca de 768 milhões de pessoas não têm acesso à água tratada no mundo e 2,5 bilhões vivem em condições sanitárias inadequadas (ONU 2012). Estima-se que aproximadamente um bilhão de pessoas carecem de acesso a um abastecimento de água suficiente, definido como uma fonte que possa fornecer 20 litros por pessoa por dia a uma distância não superior a um quilômetro. Essas fontes incluem fontes domésticas, fossos, poços e nascentes protegidas, e a coleta de águas pluviais. Causas do abastecimento inadequado de água incluem o uso ineficiente, a degradação da água pela poluição e a super-exploração das reservas de águas subterrâneas. O Relatório Global sobre Desenvolvimento e Água (ONU, 2012), alerta sobre a necessidade de políticas que reconheçam e integrem abordagens sobre prioridades nas áreas de água e energia. Algumas previsões estimam que, em 2030, a população global vai necessitar de 35% a mais de alimento, 40% a mais de água e 50% a mais de energia em relação às quantidades estimadas atualmente.

Neste contexto, a região amazônica deverá ter um papel extremamente importante. A bacia amazônica abrange uma área de 5.033.072 km², dos quais 3,9 milhões de km² estão em território brasileiro. Os rios que compõem a bacia contêm cerca de 20% de toda a água doce despejada nos oceanos e a alta taxa de precipitação na região (> 2000 mm/ano) contribui para a existência de uma exuberante rede de rios e igarapés que transportam a descarga superficial das chuvas (Junk, 1983; Sioli, 1984). Na Amazônia Central Brasileira, estima-se que cada quilômetro quadrado tenha de 2 a 4 quilômetros de igarapés, o que torna essa rede hidrográfica a mais densa do mundo (Sioli, 1984).

Riachos de cabeceira, que na região amazônica são chamados de igarapés, constituem pequenos corpos d'água que ocorrem em uma diversa amplitude de configurações climáticas, topográficas, fitofisionômicas e biogeográficas, o que os torna um dos sistemas aquáticos mais diversos estruturalmente entre os ambientes lóticos (Meyer *et al.*, 2007). Esses riachos abrigam conjuntos peculiares de espécies, que são progressivamente substituídas ao longo da rede de drenagem (Vannote *et al.*, 1980) e contribuem significativamente para a diversidade regional. As comunidades de peixes que habitam os igarapés são compostas por diversos

grupos taxonômicos, principalmente por espécies de pequeno porte, que apresentam pequenas taxas de deslocamento espacial ao longo da vida (Henderson & Walker, 1986).

Os igarapés são fortemente influenciados pela vegetação ripária, tanto nas suas características físicas e químicas quanto biológicas. Geralmente apresentam águas ácidas, devido à presença de ácidos húmicos e fúlvicos, são pobres em nutrientes e dependentes do material orgânico proveniente da floresta, já que a cobertura vegetal impede que a luz atinja a superfície da água, restringindo o crescimento de algas e plantas aquáticas. Essa baixa produtividade primária aquática se mantém a despeito das diferenças estruturais e físico-químicas da água decorrentes da composição geológica dos terrenos por onde corre a bacia (Sioli, 1984; Forsberg, *et al.* 1988).

A grande rede/malha de igarapés constitui um conjunto de habitats importantes na Amazônia, tanto como geradora quanto mantenedora da biodiversidade aquática, uma vez que estes igarapés podem conter faunas especializadas, endêmicas e ainda servem de refúgio para muitas espécies (Lowe-McConnell, 1999; Mendonça *et al.,* 2011). Entretanto, tanto a estrutura e as características abióticas e bióticas dos igarapés têm sido ameaçadas pela degradação ambiental decorrente do uso inadequado da terra e dos processos diretos e indiretos de despejo de efluentes urbanos (industrias e residências). Uma das principais fontes de distúrbios ambientais em sistemas de igarapés amazônicos é o processo desordenado de urbanização que vem ocorrendo há séculos na região, e que tem se intensificado enormemente nas últimas quatro ou cinco décadas.

Manaus, capital do estado do Amazonas, é a principal cidade da Amazônia ocidental brasileira e está completamente inserida na floresta e conectada de forma umbilical à sua bacia de drenagem. Neste sentido, perturbações causadas pela remoção da floresta e/ou a poluição dos cursos d’água, têm efeitos diretos e negativos sobre a qualidade do ambiente urbano, a biodiversidade e a saúde da população humana local e, possivelmente, regional (Anjos, 2007). A área urbana da cidade de Manaus, em virtude do grande contingente populacional e da falta de planejamento, vem crescendo de maneira acelerada e desordenada (Oliveira & Schor, 2008). Em 1960 a cidade possuía 175.703 habitantes, e em 2016 as estimativas apontam 2.094.391 habitantes (IBGE, 2016).

Este crescimento demográfico ocorreu principalmente com a criação da Zona Franca de Manaus em 1967, que ocasionou o deslocamento de populações tanto do interior do estado, quanto de outras regiões do país para Manaus (Oliveira & Schor, 2008). Com o crescimento da cidade, a floresta urbana foi reduzida a fragmentos florestais isolados. Muitos dos igarapés foram aterrados e passaram a receber grandes aportes de detritos e efluentes domésticos, devido ao processo de ocupação irregular de muitas áreas da cidade. Nem mesmo as áreas de baixios, por onde fluem os igarapés, escaparam dessa expansão descontrolada. Contudo, ainda são poucos os estudos sobre as comunidades biológicas desses ambientes aquáticos urbanos na Amazônia, que ainda se encontram sob impactos antrópicos crescentes. (Anjos, 2007).

Alguns estudos focam nos distúrbios oriundos do processo de urbanização sobre características físico-químicas da água dos igarapés. Por exemplo, o estudo realizado por Ferreira *et. al.* (2012) avaliou as alterações nos igarapés localizados na zona limítrofe entre a Reserva Ducke e a cidade de Manaus. Foram analisados parâmetros como: Condutividade elétrica e íons como Na^{+}, K^{+}, Ca^{2+}, Mg^{2+} e Fe^{2+}, nos igarapés do Bolívia, Sabiá, Aliança com Deus e Sabiá II. Os autores constataram que as características dos igarapés se modificam significativamente com o processo de urbanização, como consequência do despejo de resíduos sólidos e efluentes líquidos. Outros estudos avaliaram as consequências das mudanças ambientais na área da cidade de Manaus sobre a biota aquática dos igarapés.

Em um estudo realizado por Couceiro *et. al.* (2007) avaliou 65 igarapés que sofreram impactos antrópicos. No estudo, concluiu-se que as modificações relacionadas ao processo de urbanização alteraram fortemente a estrutura das comunidades de macroinvertebrados, reduzindo drasticamente a diversidade de espécies e alterando a sua composição local.

Estudos com este enfoque também são feitos em outras regiões do Brasil, como o realizado por Vieira (2007), que analisou a composição de um riacho alterado na bacia do rio Paraná, em Londrina. Ele destacou a grande quantidade de espécies invasoras sendo que a espécie exótica *Poecilia reticulata,* que apresenta elevada tolerância à degradação ambiental, representou 79% dos peixes coletados.

Retornando à região amazônica, Anjos (2007), avaliou o impacto da fragmentação florestal sobre as assembleias de peixes de igarapés da região de Manaus. O autor analisou as assembleias de peixes de igarapés em 15 fragmentos

florestais urbanos, visando avaliar os efeitos da fragmentação florestal e características estruturais dos igarapés sobre a composição e diversidade da ictiofauna. Alguns dos principais resultados demonstram que igarapés em bom estado de conservação apresentaram diversidade e riqueza de espécies mais altas do que igarapés poluídos por efluentes domésticos.

Dentre as espécies de peixes que compõem a ictiofauna dos igarapés amazônicos, um grupo importante é o dos Gymnotiformes, também conhecidos popularmente na região amazônica como sarapós ou peixes elétricos. Além de perfazerem um percentual significativo da abundância de peixes de igarapés (Andrade, 2016) estes peixes possuem características fisiológicas que os tornam excelentes modelos para o biomonitoramento de ambientes aquáticos, uma vez que os padrões de produção de descarga elétrica destes peixes se alteram em função da poluição presente na água. (Thomas *et. al.,* 1996, 1998*;* Ferreira, 2008; Schwertner, 2005; Rossoni, 2005; Clausen *et. al.,* 2012).

Os Gymnotiformes são peixes teleósteos de água doce, comumente conhecidos por peixes elétricos (sarapós, tuviras e ituís), assim chamados por serem capazes de gerar e detectar correntes elétricas. Endêmicos da região Neotropical, seus representantes podem ser encontrados desde o sul do México até o norte da Argentina, porém, a maior abundância de espécies ocorre na bacia amazônica (Mago-Leccia, 1994). Conforme a contagem atualizada da *Catalog of Fishes* da California Academy of Sciences (Eschmeyer & Fong, 2016), 225 espécies de Gymnotiformes estão descritas formalmente, que podem ser divididas em cinco (Albert, 2000) ou seis (Mago-Leccia, 1994) famílias, de acordo com características morfológicas, ou ainda em sete famílias com base em análises de sequências de DNA, sendo elas: Sternopygidae, Gymnotidae, Electrophoridae, Rhamphichthyidae, Hypopomidae, Eigenmanniidae e Apteronotidae (Alves-Gomes *et al.,* 1995).

Os peixes elétricos são facilmente reconhecidos por possuírem características morfológicas peculiares como: ausência de nadadeiras pélvicas, dorsal e caudal (com exceção da família Apteronotidae que possui nadadeira caudal reduzida, e de *Electrophorus*, que mantém o esqueleto da nadadeira caudal), e geralmente possuem corpo alongado e comprimido (exceto as famílias Gymnotidae e Electrophoridae, que possuem corpo cilíndrico). Possuem nadadeira anal longa que percorre quase todo o seu corpo e que permite movimentos para frente e para trás com igual facilidade. Todos os órgãos vitais são localizados na parte anterior do

corpo, o ânus e a abertura genital encontram-se posicionadas ventralmente na altura da inserção das nadadeiras peitorais (Mago-Leccia, 1994).

Cada espécie de Gymnotiformes tem uma DOE (Descarga do órgão elétrico) própria, sendo que as descargas podem ser subdivididas em dois grupos, de acordo com suas características temporais: DOE tipo pulso (peixes pulsadores: Gymnotidae, Electrophoridae, Rhamphichthyidae e Hypopomidae) e DOE tipo onda (peixes onduladores: Eigenmanniidae, Sternopygidae e Apteronotidae) (Figura 1). Peixes pulsadores possuem uma DOE de curta duração, com um longo intervalo de silêncio entre duas descargas consecutivas, podendo descarregar entre menos de 5 e mais de 120 vezes por segundo (Hz), enquanto os onduladores descarregam em uma frequência geralmente mais elevada, com intervalos regulares e taxas de descarga entre 60 e 2100 (Hz). Nos onduladores a fase silenciosa é praticamente inexistente, enquanto nos pulsadores a fase silenciosa é facilmente percebida. (Bullock *et al*., 1979; Bastian, 1994; Alves-Gomes, 1997).

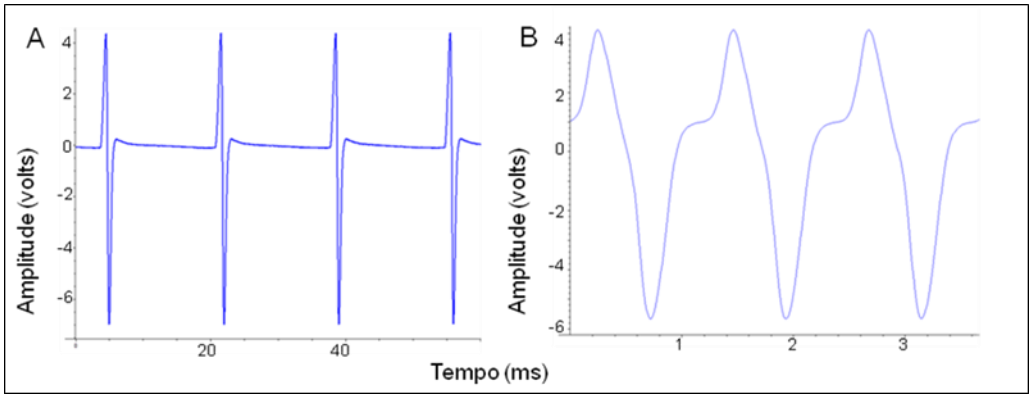

Figura 1. Exemplos de DOEs dos tipos pulso e onda. Os gráficos de Amplitude (Volts) x Tempo (milissegundos) mostram a variação da descarga ao longo do tempo, conforme visto na tela de um osciloscópio. (A) DOE tipo pulso do peixe *Microsternarchus* (linhagem C), a duração de uma descarga é menor que o intervalo entre duas descargas. (B) DOE tipo onda do peixe *Parapteronotus hasemani*, neste caso, a duração da descarga é maior ou igual ao intervalo entre duas descargas. Adaptado de Petersen (2013).

A capacidade destes organismos de gerarem correntes elétricas está associada à presença de um ou mais órgãos especializados denominados órgãos elétricos, este(s) órgão é formado por células chamadas de “eletrócito”. A DOE gera um campo elétrico ao redor do peixe que é constantemente monitorado por (eletroreceptores), células sensoriais localizadas na epiderme dos peixes. Os órgãos elétricos e os eletroreceptores, trabalhando em conjunto, formam o Sistema

Eletrogênico e Eletrosensório (SEE), por meio do qual os Gymnotiformes são capazes de se comunicar, sinalizando sua identidade ou estados comportamentais para outros peixes e de explorar o ambiente em que vivem, detectando objetos próximos que distorcem seu campo elétrico (Alves-Gomes, 2001; Bullock, 2005). O funcionamento e a eficiência do SEE podem sofrer drásticas alterações caso ocorra alguma mudança nas características da água onde eles se encontram. (Bullock *et al.,* 1979; Clausen *et al.,* 2012; Alves-Gomes 2014).

Acredita-se que o SEE conferiu a estes peixes uma vantagem adaptativa importante, possibilitando sucesso aos Gymnotiformes em ambientes neotropicais (Alves-Gomes, 1997). Entre as razões para que isso tenha sido possível pode-se mencionar que, em função do SEE, os Gymnotiformes não precisam de luz para se orientar, achar alimento e se comunicar (Alves-Gomes, 2014). O SEE possibilita os hábitos noturnos, o que, além de minimizar a pressão de predadores que usam principalmente a visão, também possibilita uma partilha de recursos (alternância de turnos com os peixes diurnos), permitindo também a colonização de ambientes desprovidos de luz, como os canais profundos de grandes rios neotropicais, onde os Gymnotiformes são especialmente diversos e abundantes (Bullock 1979, 2005).

Estudos laboratoriais têm demonstrado que o SEE pode servir como um sistema biológico adequado para biomonitoramento de ambientes aquáticos em tempo real (Kay & Lewis, 1993; Thomas *et. al.*, 1996, 1988; Alves-Gomes *et. al.*, 2004; Schwernter, 2005, 2011; Rossoni, 2005; Ferreira, 2008; Clausen *et. al.* 2012). Estes estudos comprovam que estes peixes modificam o padrão das suas DOEs quando expostos a concentrações, mesmo pequenas, de vários tipos de poluentes. Estas mudanças nas características das DOEs podem ocorrer em função da ação direta dos poluentes na fisiologia do órgão elétrico, ou de forma indireta, quando um determinado poluente atua em outros níveis dos processos fisiológicos e bioquímicos dos peixes (Alves-Gomes 2014). Como as DOEs são um produto da atividade de um núcleo cerebral, drogas e poluentes que atuam no sistema nervoso central também podem causar alterações nos padrões de descarga dos Gymnotiformes.

Clausen *et. al.* (2012), fizeram uma revisão sobre a literatura sobre a influência da utilização de drogas e poluentes sobre aspectos da DOE de peixes Gymnotiformes e Mormyriformes. Segundo os autores já foram utilizadas trinta e cinco substâncias dividas em dezoito publicações. Três espécies de Gymnotiformes

foram utilizadas: *Gymnotus carapo*, *Eigenmannia virescens* e *Apteronotus albifrons* com diferentes dosagens *de* poluentes e drogas. O autor destaca os trabalhos realizados por Lewis *et. al.* (1992, 1993, 1994), que utilizou a espécie *Campylomormyrus tamandua* (Mormyridae) avaliando o efeito de poluentes como: cadmio, nitrato, cianeto, entre outros. Também é discutido o trabalho realizado por Thomas *et. al.* (1996, 1998) que avaliou as variações da DOE de *Apteronotus albifrons* submetidos a mudança de temperatura e pH, e submetidos a drogas como cianeto, utilizando um set experimental similar ao utilizado no presente trabalho, foram analisados diferentes parâmetros da descarga dos peixes, inclusive os relacionados à forma da DOE, um diferencial positivo nos trabalhos já realizados.

Dentre os Gymnotiformes, o gênero *Microsternarchus* têm-se consolidado como um gênero modelo por apresentar várias vantagens e aspectos positivos na sua utilização, incluindo a fácil adaptação ao cativeiro, larga abundância em igarapés amazônicos e consequente facilidade de coleta de indivíduos na natureza, e a presença de uma DOE bastante estável (Ferreira, Nogueira, Alves Gomes, 2009, 2006, 2014). Até recentemente, *Microsternarchus* foi considerado um gênero monotípico, descrito por Fernández Yépez em 1968 cujo a espécie foi chamada *Microsternachus billineatus*. Entretanto, Maia (2011) realizou um estudo de sequenciamento molecular com marcadores da região controle do DNA mitocondrial em indivíduos de dois tributários do alto rio Negro e de outros dois tributários do médio rio Negro. Os resultados comprovaram uma diferenciação genética das populações analisadas, separando-as em pelo menos quatro linhagens bastante distintas geneticamente. Cox Fernandes *et. al.* (2014), com base no trabalho de Maia (2011), descreveram um novo gênero (*Procerosternachus*), e no ano seguinte Cox *et. al.* (2015) descreveram *Microsternachus brevis.*

Ainda que a sistemática do gênero esteja em fase de mudança, vários estudos no Laboratório de Fisiologia Comportamental e Evolução - INPA têm utilizado indivíduos de *Microsternarchus* para estudos moleculares, comportamentais e de biomonitoramento, como: Nogueira (2006) avaliou a diversidade do repertório eletrocomunicativo de *Microsternachus* sp. durante a maturação sexual em cativeiro e comportamento agonístico em cativeiro (2011). Ferreira (2009) observou o efeito de combustíveis fosseis como gasolina e óleo diesel nos padrões de DOE de *Microsternarchus*. Petersen (2013) teve como objetivo caracterizar as respostas

individuais de peixes do gênero *Microsternarchus* submetidos a diferentes sinais interferentes.

Sob esta perspectiva, seria importante complementar os trabalhos laboratoriais já realizados, testando os possíveis efeitos de águas de igarapés urbanos reconhecidamente poluídos nos padrões de descargas destes peixes. Trabalhos preliminares do LFCE (não publicados) demostraram a ausência de *Microsternarchus* (e outros Gymnotiformes) em igarapés urbanos da cidade de Manaus. As águas destes igarapés, por acumularem efluentes de origem antrópica dos mais variados tipos, permitem que seja testado o efeito de vários poluentes em várias concentrações, sobre as características da DOE destes peixes. Com esses resultados, pode-se avaliar mais adequadamente não só as razões destes peixes não serem mais encontrados nos corpos de água urbanos de Manaus, mas também a possibilidade de uso de um sistema de biomonitoramento da qualidade de ambientes aquáticos (urbanos ou não), em tempo real, tendo *Microsternarchus* sp. (ou outros Gymnotiformes) como biossensores.

Neste estudo, procura-se contribuir para o aprimoramento deste sistema, estudando-se o efeito de um complexo de poluentes presentes nas águas de um igarapé poluído de Manaus, no padrão de descargas de *Microsternarchus* sp., um pequeno gymnotiforme pulsador, abundante em igarapés não poluídos na Amazônia. Este é o primeiro estudo do LFCE que não busca o efeito específico de um único poluente nos padrões de DOE, mas o resultado da ação sinergética de vários, em tempo real.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral:

- Determinar e quantificar as alterações nos padrões biofísicos das descargas do órgão elétrico (DOE) de *Microsternarchus* sp. expostos a diferentes concentrações da água oriunda de um igarapé urbano degradado da cidade de Manaus.

2.2. Objetivos específicos:

- Determinar os padrões biofísicos normais (controle) da DOE de *Microsternarchus* sp.

- Quantificar os parâmetros físico-químicos da água poluída utilizada no experimento, e suas diluições, proveniente do igarapé degradado, e compará-los com os medidos na água padrão (controle).

- Identificar e caracterizar as mudanças nos parâmetros das DOEs de *Microsternarchus* sp. submetidos a diferentes diluições da água poluída e em função do tempo de exposição aos poluentes.

3. Material e métodos

3.1. Coleta e manutenção dos peixes para os experimentos

Foram coletados 60 indivíduos do gênero *Microsternarchus* no igarapé “TI 12” em julho/2015, localizado na Reserva Florestal Adolpho Ducke (02°57'56.34" S, 59°54'56.40" O), na microbacia do igarapé Tinga (Figura 2). O igarapé faz parte da drenagem leste da Reserva Ducke, que deságua no rio Amazonas. Antes do início da coleta, os seguintes parâmetros físico-químicos da água foram mensurados *in loco*: condutividade elétrica (14 µS/cm), temperatura (24,61 °C), pH (5,95) e Oxigênio dissolvido (72,1%), com a utilização de sonda multiparamétrica YSI modelo 556 MPS.

Figura 2. Localização da Reserva Ducke na região nordeste do município de Manaus, AM, com a indicação do igarapé onde os indivíduos de *Microsternarchus* sp. foram coletados para o estudo.

Para a localização dos peixes no igarapé foi utilizado um detector de peixes elétricos, que é constituído de uma haste com dois eletrodos de metal fixados em uma de suas extremidades, conectados a um circuito eletrônico com um amplificador, que amplifica a DOE e a converte em sinal sonoro, permitindo a localização exata dos peixes. Após a localização, os indivíduos foram capturados com a utilização de um puçá, acondicionados em sacos plásticos contendo água do local e transportados para o LFCE/INPA, onde foram aclimatados.

No LFCE, os peixes foram inicialmente introduzidos às novas condições de cativeiro. Os sacos plásticos com peixes e água do local de coleta foram colocados abertos dentro de aquários com água padrão e ao longo de um período de 30-60 minutos, o saco de coleta foi preenchido com água do aquário. Uma vez que o saco plástico estivesse cheio, os peixes eram liberados no aquário com uma diluição lenta da água do local de coleta com a “água padrão” do laboratório, que é oriunda de um dos poços semiartesianos do INPA. Porém, antes de ser utilizada nos aquários, esta água é acondicionada em tanques de 2000L contendo um sistema de filtro biológico,

fundo com seixos, areia e aeração constante, por pelo menos uma semana. Esse procedimento serve para elevar o oxigênio dissolvido e trazer o pH para valores próximos ao valor típico dos igarapés de água clara ou preta da bacia amazônica e local de origem dos peixes, por volta de 5,5.

Os aquários utilizados têm capacidade de quarenta litros, com filtração biológica e aeração constante. Cada aquário continha até 10 peixes, que foram mantidos nestas condições por 15 dias antes da realização dos experimentos. Os parâmetros da água nos aquários de manutenção foram medidos periodicamente e mantidos próximos aos valores da água do local de coleta.

Os aquários de manutenção foram mantidos no laboratório com fotoperíodo natural (cerca de 12h luz:12h escuro), e os peixes alimentados com enquitreias (*Enchytraeus albidus*) e naúplios de artêmia (*Artemia salina*), fornecidos vivos uma vez por dia. Diariamente as sobras de alimentos e fezes foram aspiradas dos aquários com mangueira de borracha e o nível da água reestabelecido com a água padrão do laboratório.

Com o objetivo de assegurar uma identificação taxonômica e sistemática adequada, dez espécimes utilizados no experimento tiveram uma amostra de tecido muscular retirada para análise molecular, com o objetivo de determinar a linhagem ou espécie que os peixes pertenciam. Esse procedimento foi necessário uma vez que estudos relativamente recentes (Maia e Alves Gomes 2012; Cox-Fernandes et. al. 2014; Cox-Fernandes *et. al.* 2015) demonstram que o gênero *Microsternarchus* engloba um complexo de espécies, muitas ainda não descritas formalmente. A identificação foi feita utilizando-se o protocolo do código de barras de DNA (*DNA barcode*), ou seja, foi sequenciado um fragmento do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COI), que foi um dos marcadores utilizados por Maia (2011). Os resultados da análise molecular por não fazerem parte dos objetivos deste trabalho foram colocados em anexo.

Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa com Uso de Animais do INPA (CEUA), sob licença número 036/2012 para José A. Alves Gomes / LFCE.

3.2. Coleta da água poluída e diluições testadas

A água poluída utilizada nos experimentos é proveniente do igarapé Matrinxã, localizado próximo ao Aterro Sanitário de Manaus (02°57’56.66” S; 60°00’19.92” O) (Figura 3). Este igarapé foi escolhido porque, entre outras razões associadas à logística e localização, possui um histórico de acompanhamento das suas características físico-químicas, em estudos realizados por outros grupos de pesquisa do INPA. Assim, muitas informações sobre a qualidade da água já estão disponíveis na forma de publicações, dissertações e teses. Para os experimentos realizados neste estudo, testou-se o efeito da água poluída do igarapé em três níveis de diluição: 75%, 50% e 25% e ainda, o controle, com água padrão do laboratório.

Figura 3. Vista área de Manaus (esquerda), com detalhe da localização do ponto de coleta da água poluída no igarapé Matrinxã.

In loco, no dia da coleta (27/10/2015), foram mensurados os seguintes parâmetros por meio de uma sonda YSI modelo 556 MPS: condutividade elétrica (346 µS/cm), pH (7,26), temperatura (26,4 °C) e Oxigênio dissolvido (3,94 mg/l). Um litro desta água foi armazenado em um frasco de polietileno para análises físico-químicas específicas. Os mesmos parâmetros físico-químicos foram também medidos ao longo dos experimentos, para cada respectiva diluição, ao final de um

experimento específico, nas respectivas datas: “25%” 30/10/2015; “50%” 31/10/2015; “75%” 01/11/2015. A amostra da água padrão foi obtida coletando a água diretamente do aquário de manutenção no dia 01/11/2015.

Vários outros parâmetros físico-químicos das águas testadas foram medidos em colaboração com o Laboratório de Química Ambiental/LQA do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/INPA. As cinco amostras (controle, 25%, 50%, 75% e 100%) foram filtradas a vácuo, com filtro de fibra de vidro Whatman GF/F (0,7 µm de poro), para a determinação dos seguintes parâmetros: Material em suspensão (MS), Cor, Turbidez, Demanda química de oxigênio (DQO), Ferro Total (Fe), Ferro dissolvido, Silício (Si), Dureza (mgCaCO3/L), Cálcio (Ca), Magnésio (Mg), Potássio (K), Fosfato (PO4) e Cloro (Cl).

Além destas análises laboratoriais, a água foi monitorada utilizando equipamentos eletrônicos em todos os experimentos antes e após a diluição. Para o pH foi utilizado um pHmetro de bancada da marca Phtek modelo PHS-3E-220 e para a condutividade, temperatura e oxigênio dissolvido foi utilizada uma sonda multiparâmetro da marca YSI modelo 556 MPS.

Amostras da água também foram submetidas a análise de nitrato, nitrito e amônio com o auxílio do Centro de Pesquisas de Recursos Minerais-CPRM de Manaus no dia 25/11/2015, as diluições foram as mesmas, porém as amostras foram coletadas em datas diferentes.

Foram coletados cento e vinte litros da água do Igarapé Matrinxã no dia 27/10/2015 que foram utilizados nos experimentos. Esta água foi acondicionada em galões plásticos com capacidade de cinquenta litros, mantidos em temperatura ambiente e sob abrigo da luz. Para minimizar possíveis efeitos nos resultados devido a depuração que ocorre naturalmente na água, a determinação da ordem dos experimentos foi realizada de modo aleatório de acordo com o percentual de diluição da água poluída, imediatamente após a coleta da água.

O aquário utilizado nos experimentos sobre os efeitos da água poluída sobre a DOE de *Microsternarchus* sp. media 40 cm x 10 cm x 29 cm e espessura do vidro de 0,5 cm, consequentemente tinha um volume total de 10 litros. Porém o volume final de água nos experimentos foi padronizado em oito litros. Os peixes foram expostos a quatro concentrações (tratamentos) com a água poluída:

1) 0%: neste caso, também usado como controle, os peixes foram expostos somente à água padrão do LFCE. Um volume inicial de água de dois litros foi completado com seis litros de água padrão, depois do período de pré-teste;
2) 25%: volume inicial de seis litros de água padrão, sendo que o volume de água poluída introduzida após o pré-teste correspondeu a ¼ do volume total da água no aquário experimental (ou seja, dois litros), para um volume final de 8 litros;
3) 50%: volume inicial de quatro litros de água padrão, e o volume de água poluída introduzida correspondeu à metade do volume total da água no aquário experimental (quatro litros);
4) 75%: Volume inicial de dois litros de água padrão, da mesma forma que o controle, o volume de água poluída correspondeu a ¾ do volume total da água no aquário experimental (ou seja, seis litros).

3.3. Experimentos

Todos os peixes utilizados foram gravados individualmente. Para a gravação das DOEs, o indivíduo a ser testado foi acondicionado em um cilindro de plástico perfurado (bob de cabelo), adequado ao tamanho do peixe, ou seja, de forma que o peixe ficasse com o corpo inteiro dentro do cilindro. Este cilindro tem a função de restringir os movimentos do peixe e foi colocado na região central, no fundo do aquário experimental.

O sinal do peixe foi captado por meio de três eletrodos de prata, sendo que o eletrodo positivo foi colocado à frente da cabeça do peixe, o negativo atrás da cauda, e o terceiro, o neutro, que serve como eletrodo referencial, foi situado em uma posição equidistante aos outros dois. Desta forma, as DOEs foram captadas e gravadas de forma padronizada para todos os indivíduos testados. Estes eletrodos captam a DOE e a enviam a um amplificador diferencial AC/DC® (BMA-200, CWE Inc., Ardmore PA, USA) com capacidade de ganho variável de doze níveis, de 10x até 150.000x, sendo possível adaptar o ganho apropriado conforme a intensidade da DOE do indivíduo ou espécie. Depois de amplificada, a DOE é enviada a um osciloscópio da marca Tektronics®, modelo TDS 2024, onde é possível visualizar a

forma da onda e a frequência instantânea em Hertz. Concomitantemente, o sinal amplificado também é enviado para um conversor analógico/digital da marca Data Translation® e assim as informações geradas das DOEs finalmente são enviadas a um computador, onde são armazenadas para análises posteriores. As DOEs foram gravadas com uma taxa de amostragem de 50 KHz (50000 pontos por segundo) e uma resolução de 16 bits. A aquisição de sinais é controlada por meio de protocolos específicos desenvolvidos no LFCE para o programa MatLab 6.0®. A maior parte do "set" de gravação ficou alocado dentro de uma Caixa de Faraday, que tem a função de reduzir interferências eletromagnéticas externas (Figura 4).

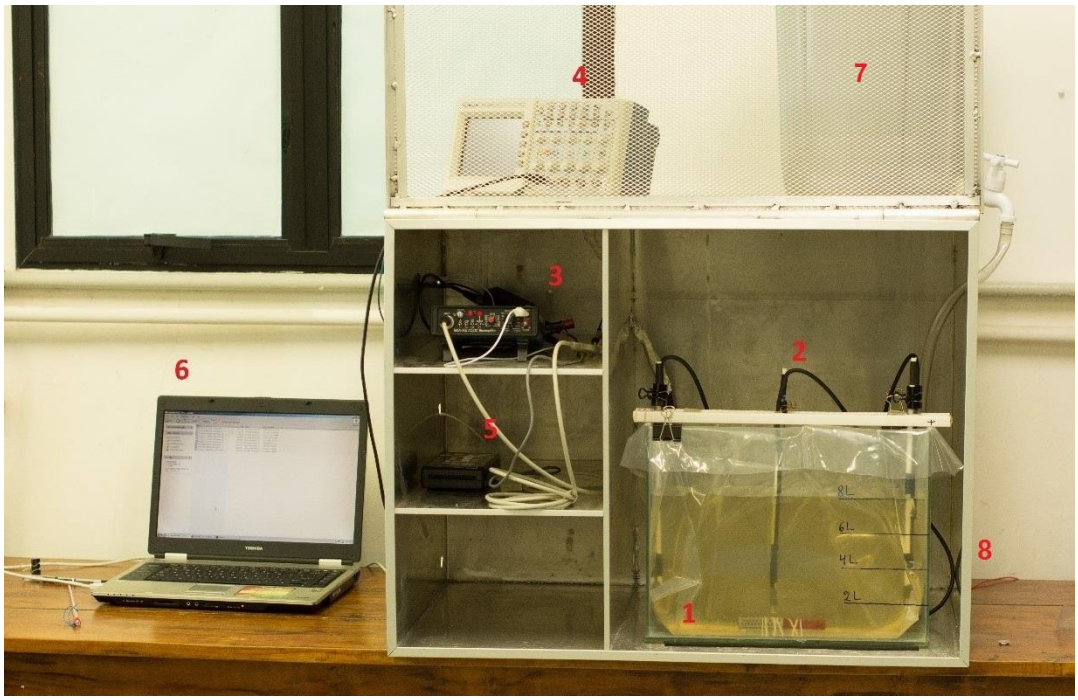

Figura 4. Arranjo das condições experimentais de gravação das DOEs de indivíduos de *Microsternarchus* sp.: (1) aquário, (2) eletrodos, (3) amplificador, (4) osciloscópio, (5) conversor analógico/digital, (6) computador, (7) balde e (8) Caixa de Faraday.

Depois da descarga digitalizada, um protocolo padronizado do MatLab permite serem mensurados para cada observação, dezesseis parâmetros das DOE, sendo eles: média dos intervalos entre pulsos (s); taxa média da frequência (Hz); coeficiente de variação; fase silenciosa (ms); duração da DOE (ms); relação da duração da DOE/fase silenciosa; relação entre pico positivo e pico negativo (amplitude); Polaridade de balanço (%); frequência de maior poder (KHz); Duração efetiva do pulso (ms); duração da primeira fase (s); duração da segunda fase (s);

duração da primeira fase (%); duração da segunda fase (%); área da primeira fase (%); área da segunda fase (%). Este mesmo protocolo foi detalhado nos trabalhos realizados por Cox *et. al.* (2014, 2015).

Cada experimento teve a duração total de sete horas. Inicialmente o peixe foi acondicionado no cilindro de plástico telado, que subsequentemente foi colocado no aquário experimental. As duas primeiras horas serviram para a aclimatação do peixe às condições experimentais, e nenhuma medição da DOE foi feita neste período. Ao longo da hora seguinte (3ª hora), a DOE começou a ser monitorada, e esse período serviu para determinar os padrões “normais” de DOE de cada peixe utilizado, antes da introdução da água poluída. Este período de uma hora foi denominado de “pré-teste”. Na aclimatação e no pré-teste os peixes não foram expostos a nenhum tipo de interferência e/ou poluente.

Todos os experimentos foram feitos com um volume final de oito litros de água, sendo que dependendo da diluição testada, o volume inicial de água padrão no aquário (aclimatação e pré-teste) foi de dois, quatro ou seis litros, conforme mencionado anteriormente. Como uma forma de se avaliar o efeito do distúrbio mecânico causado pela mudança do volume de água no aquário experimental, além dos quarenta peixes que foram submetidos às diferentes diluições, dez peixes foram monitorados por doze horas (aproximadamente das 08:00 ás 20:00) com os mesmos protocolos de gravação discutidos anteriormente, porém nestes experimentos os aquários foram mantidos permanentemente com quatro litros de água padrão sem nenhuma manipulação experimental. Os peixes iniciaram a serem gravados imediatamente depois de acondicionados nos cilindros e colocados no aquário experimental. Estas gravações serviram para, dentre outras coisas, determinar as variações naturais dos padrões de descarga da população de *Microsternarchus* durante o dia, englobando o período em que os experimentos (com as diluições) foram feitos. Estas gravações também serviram como um segundo controle, ou branco (Resultado em anexo).

Nos experimentos, ao término do período de pré-teste (ou seja, ao final da terceira hora), o volume final de oito litros foi completado no aquário experimental, em função da diluição pretendida para cada tratamento. A água (padrão ou poluída) foi introduzida no aquário experimental com o mínimo de distúrbio possível, sendo liberada por gravidade a partir de um balde colocado acima do nível do aquário (Figura 4). O balde possuía uma torneira, de maneira que o fluxo de água foi

regulado para ser semelhante nos quatro tratamentos. A torneira do balde foi conectada ao aquário por meio de uma mangueira flexível de PVC que ficava junto a uma das laterais do aquário.

Após a fase de pré-teste e completado o volume de 8 litros (nas diferentes diluições), as gravações foram reiniciadas imediatamente e seguiram por mais quatro horas. Este período de gravação após a introdução da água poluída, foi denominado “teste”. Para evitar que a água poluída entrasse em contato direto com as paredes do aquário e eventualmente o impregnasse com substâncias poluentes, o aquário experimental foi revestido internamente com um saco plástico que foi trocado a cada experimento. Nenhum peixe foi usado em mais de um experimento, e o número de indivíduos testados nos tratamentos “controle”, “25%”, “50%” e “75%” foram, respectivamente, 10, 10, 11 e 9.

As gravações das DOEs, a partir do pré-teste, foram realizadas em intervalos de 15 minutos e cada sessão de gravação teve duração de cinco segundos. Consequentemente, foram geradas vinte observações (gravações) para cada peixe, sendo quatro observações referentes ao pré-teste (uma hora), e outras dezesseis observações para o período de teste (quatro horas).

Os parâmetros limnológicos da água no aquário experimental (temperatura, condutividade elétrica, oxigênio dissolvido e pH) foram mensurados em todos os experimentos, antes e após a adição da água poluída, utilizando sonda multiparamétrica YSI 556 MPS e pHmetro Phtek modelo PHS-3E-220. A temperatura em todos os experimentos foi mantida em torno em de 25°C, por meio do controle da temperatura ambiente regulada pelo condicionador de ar do laboratório.

Ao término de cada experimento o peixe foi retirado do cilindro de contenção e imediatamente colocado em um recipiente contento água e gelo, com o objetivo de induzir torpor hipotérmico. Nessas condições cada peixe testado recebeu uma identificação única e foi fotografado utilizando-se uma escala de cinco centímetros (Figura 5).

Figura 5. Fotografia de indivíduo de *Microsternarchus* sp., realizada ao término de um dos experimentos. A escala posicionada acima do peixe contém um código individual de identificação.

Após a fotografia enquanto estavam sob anestesia, os indivíduos foram submetidos a eutanásia por hipotermia. Dez peixes foram amostrados para a análise molecular do *DNA Barcode*. Cinco indivíduos foram depositados na coleção ictiológica do INPA e o restante dos 35 exemplares foram depositados na coleção do LFCE, para análises sistemáticas posteriores. A água utilizada foi acondicionada em camburões de plástico específicos para posterior descarte segundo as regras institucionais.

3.4. Análise de dados

É possível classificar as respostas dos parâmetros das DOEs medidos, em dois grupos: os que representam aspectos temporais da DOE e os que representam aspectos da forma da DOE. É importante determinar se as variações nas DOEs podem ser detectadas na forma de DOE, no aspecto temporal da descarga, ou em ambos.

Para representar os parâmetros temporais das DOEs foi escolhida a média da frequência, que é dada em Hertz (Hz). Este parâmetro é o principal parâmetro associado ao ritmo de descarga e explica adequadamente as variações nas taxas de descarga dos peixes elétricos, e em muitos dos trabalhos feitos com Gymnotiformes é o único parâmetro que é levado em conta (Kay & Lewis, 1993; Thomas et. al., 1996, 1988; Alves-Gomes et. al., 2004; Rossoni, 2005; Ferreira, 2008; Clausen et.

al. 2012). A frequência representa a relação da quantidade de descargas com o tempo. O valor dado em Hz demonstra quantas vezes o peixe descarrega em um segundo. Por exemplo, um peixe que descarrega a 50 Hz descarrega 50 vezes por segundo. Na bibliografia internacional a frequência também pode ser representada pelo seu valor complementar (1/frequência) que é o intervalo entre pulsos, também chamado de IPI, ou "*Interpulse Interval*" (Thomas *et. al.* 1996, 1988, Bullock 2005).

Para representar os parâmetros de forma de onda da DOE, escolhemos o "PP rel" que é a "Relação pico a pico" de cada pulso, que quantifica a relação da amplitude entre o pico positivo e o pico negativo da DOE. O PPF (Peak Power Frequency), retirado da análise de Fourier (em Hz), representa o valor de maior energia da descarga e o "P/S ratio" que é relação da duração do pulso (da DOE) dividido pelo período de silencio do órgão elétrico, a cada ciclo de descarga. Todos os valores foram normalizados como explicado na metodologia. Os protocolos desenvolvidos no LFCE para as análises das gravações das DOEs, inicialmente calculam a média de todos os pulsos gerados em cada gravação de 5 segundos. Para este pulso médio, o protocolo quantifica 16 parâmetros da DOE (os mesmos parâmetros analisados no trabalho realizado por Cox *et. al.*, 2014 e 2015), e extrai a média para cada parâmetro, gerando uma planilha em formato Excel. Ou seja, a análise das gravações de cada peixe gera uma planilha com os valores médios de cada variável medida, para cada gravação de 5 segundos. Para cada experimento, é montada uma planilha com os valores individuais de cada peixe, para cada tempo de amostragem.

Neste estudo, os valores obtidos para cada quinze minutos foram agrupados em pares e as médias para cada par foram calculadas. Desta forma, as tabelas finais continham valores para janelas temporais de meia hora, para cada peixe. Consequentemente, o número de observações para cada peixe (experimento) passou a ser duas observações referentes ao pré-teste, e oito referentes ao teste (após a diluição).

Para cada tratamento, os valores calculados para cada peixe foram normalizados como uma proporção do valor inicial, de forma a eliminar as variações individuais e permitirem o agrupamento e comparação entre indivíduos. A normalização foi feita da seguinte maneira: primeiramente foi calculada a média do período de pré-teste para cada indivíduo. Utilizando-se a média do pré-teste é feito seguinte cálculo: do valor de cada observação do período de teste é subtraída a

média do pré-teste, e este resultado é dividido pela média do pré-teste. Depois da normalização, foi feito o cálculo da média entre os indivíduos, para cada tratamento experimental.

Depois de realizadas as análises prévias de normalidade e heteroscedasticidade dos dados, foi realizada uma análise de variância de medidas repetidas no tempo (ANOVA MR). Esta análise estatística permite comparar os dados entre os tratamentos (Controle, 25%, 50% e 75%) e entre os valores de pré-teste e teste em cada tratamento. Seguindo, foi realizado o teste *post hoc* de Bonferroni de comparações entre os grupos, para determinar quais tratamentos (e observações) diferiam dos demais. Os testes foram realizados utilizando-se o software Statistica®.

4. Resultados

4.1. Análise dos parâmetros físico-químicos da água

Os parâmetros físico-químicos da água utilizadas nos experimentos podem ser visualizados na Tabela 1. Os valores de pH, condutividade e oxigênio dissolvido foram obtidos por meio do cálculo das médias das medições realizadas diariamente (após a diluição da água poluída). Assume-se que os valores de cada parâmetro, no período pré-teste de cada experimento, é o mesmo da água padrão.

Tabela 1: Resultados das análises dos parâmetros físico químico da água e das diluições (amostras) utilizadas.

Parâmetros	**Água padrão**	**Água poluída 25%**	**Água poluída 50%**	**Água poluída 75%**	**Água poluída 100%**
pH*	5,47 ± 0,56	6,93 ± 0,38	7,19 ± 0,13	7,23 ± 0,17	7,26
Condutividade* (µS/cm)	85,23 ± 6,02	157,33 ± 2,52	237,7 ± 6,82	308,9 ± 7,92	346,0
OD* (mg/L)	11,82 ± 1,15	7,8 ± 0,97	6,39 ± 1,6	5,3 ± 0,82	3,93
DQO (mg/l)	6,85	23,04	35,49	45,45	49,58

Material sólido (mg/L)	1,00	2,33	1,33	0,67	34,25
Cor (mgPt/L)	153,18	26,74	52,34	91,9	300,56
Turbidez (NTU)	0,26	1,82	2,60	2,86	50,44
Fe Total (mg/L)	0,205	0,395	0,694	1,119	2,342
Fe Dissolvido (mg/L)	0,187	0,196	0,26	0,214	0,278
Si $(OH)^4$ (mg/L)	7,319	6,671	5,632	4,663	3,462
Dureza (mgCaCO3/L)	<0,02	10,24	18,02	22,7	-
Ca^{++} (mg/L)	<0,02	1,84	3,2	4,01	-
Mg^{++} (mg/L)	<0,02	1,12	1,99	2,53	-
K^+ (mg/L)	0,71	5,238	11,914	13,583	20,722
Na^+ (mg/L)	9,24	12,942	14,173	17,868	20,351
NO_2^- (nitrito) (mg/L)**	0,009	1,24	2,64	1,54	5,2
NO_3^- (nitrato) (mg/L)**	12,3	21,8	26,5	35,5	22,3
NH_4 (amônio) (mg/L)**	<0,1	0,943	2,319	4,278	11,693
PO_4 (mg/L)	0,267	0,2	0,279	0,148	-
Cl (mg/L)	19,34	21,95	25,65	28,11	41,72

(*) Resultados obtidos através dos valores médios das análises diárias utilizando equipamentos eletrônicos.

(**) Resultados obtidos com as análises realizadas no Centro de Pesquisa de Recursos Minerais – CPRM.

4.2. Efeitos da água poluída nas DOEs de *Microsternarchus* sp.

A Figura 7 representa as variações de frequência ocorridas nos quatro tratamentos ao longo das cinco horas de monitoramento das DOEs. Mesmo que o resultado geral da ANOVA MR tenham sido marginalmente F (27, 324) =1,4665, p=0,06641, nos testes par a par a variação foi significativa (P≤0,05). No tratamento 50% as variações foram significativas (em comparação com os seus pré-testes) a

partir de três horas de exposição. No tratamento 75% as variações significativas começaram com duas horas e meia de exposição à água poluída em relação aos seus pré-testes (variações neste caso, também ocorreram nas comparações com os pré-testes dos outros tratamentos. No tratamento 25% nenhuma mudança significativa foi observada em relação ao tratamento controle e ao seu respectivo pré-teste. Contudo, as variações no tratamento 25% chegaram a p=0,09, e no tratamento controle todas as comparações foram nulas, (p=1,00).

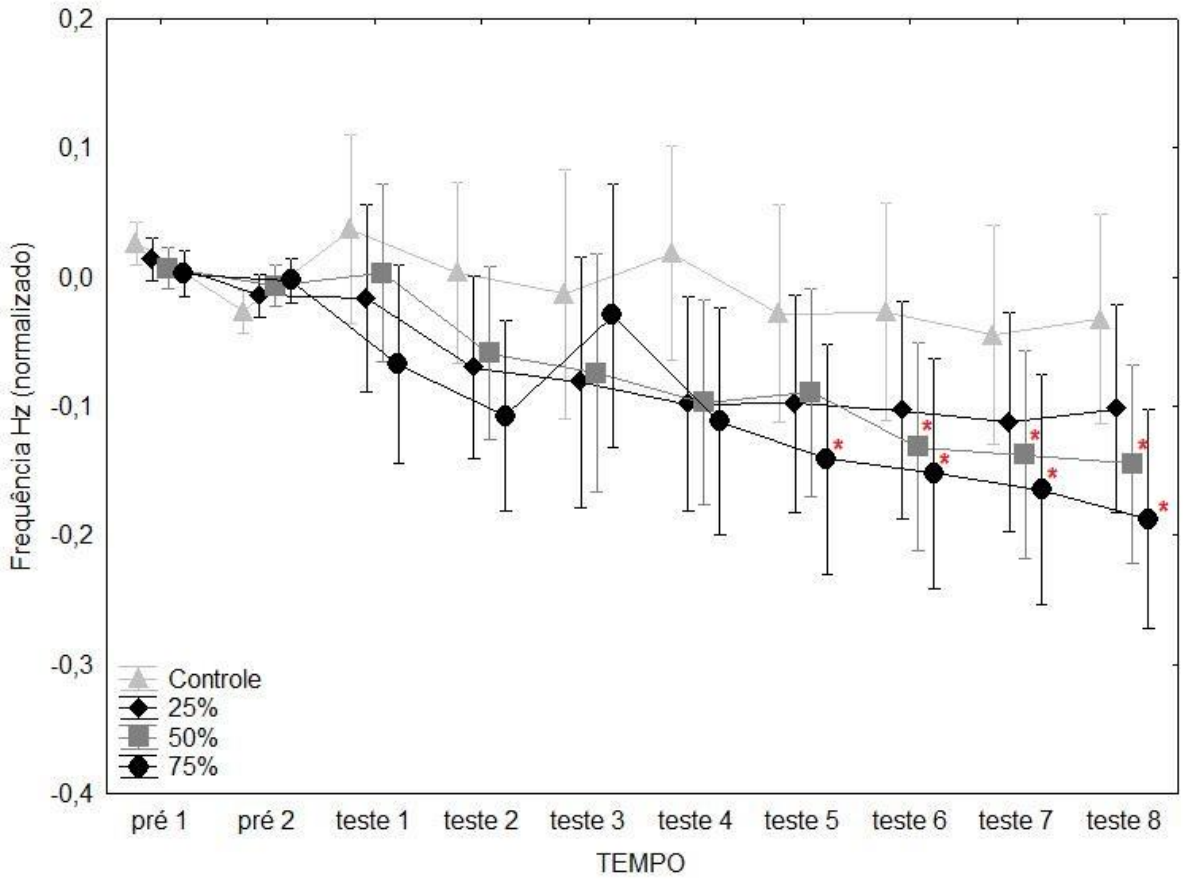

Figura 6. Representação gráfica das variações na frequência das DOEs (em Hertz, valores normalizados), mensuradas a cada meia hora ao longo de um período de cinco horas. Controle indica as frequências mensuradas em aquário contendo água padrão (não poluída), e os valores de porcentagem indicam as diferentes concentrações de água poluída nos tratamentos experimentais. (*) P<0,05).

Os gráficos a seguir mostram a variação nos quatro tratamentos durante as cinco horas de monitoramento, para os três parâmetros relacionados aos aspectos da forma da descarga: PP rel (Figura 7), PPF (Figura 8) e P/S ratio (Figura 9) , não

foram observadas diferenças significativas para estes parâmetros em nenhuma das concentrações de água poluída [PP rel: F (27,324) =82672, p=0,71635; PPF: F (27, 324) =1,1273, p=0,30540; P/S ratio: F (27, 333) =79042, p=0,76465].

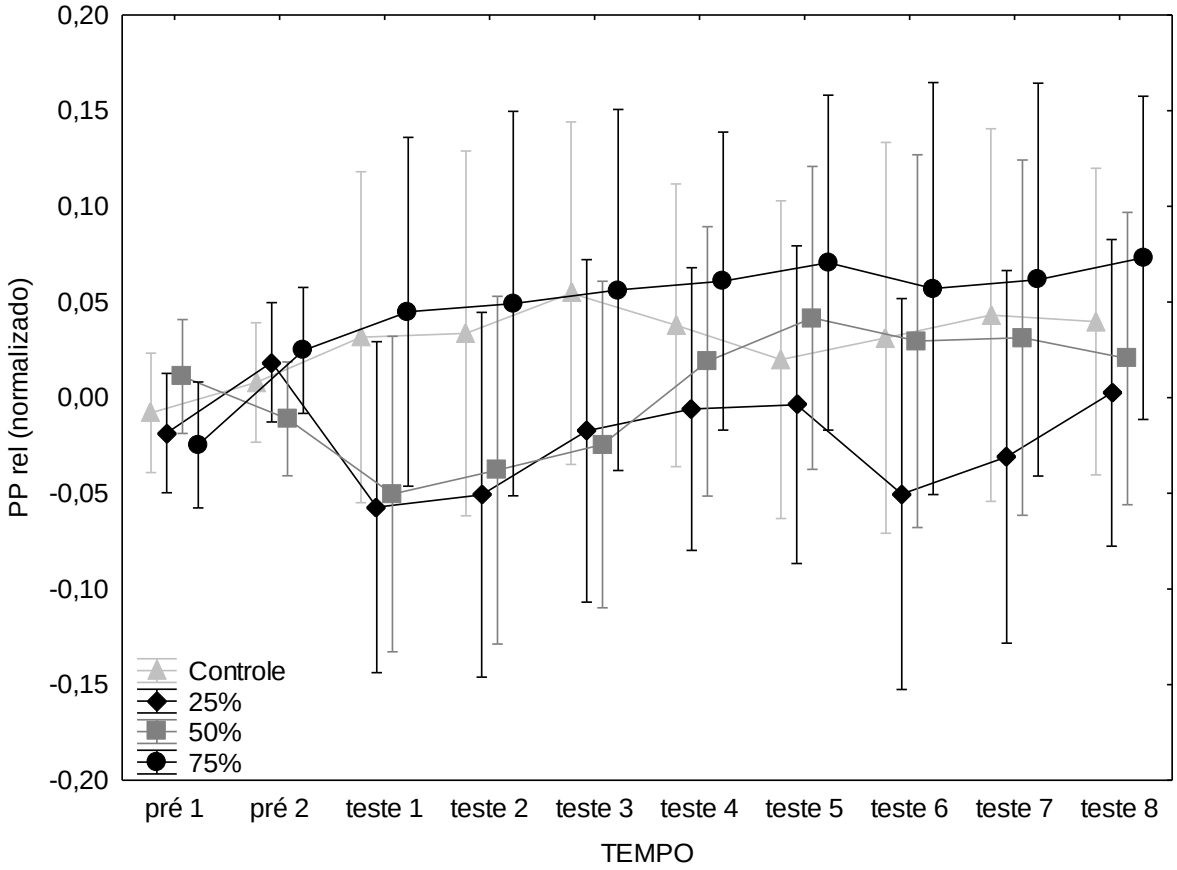

Figura 7. Representação gráfica das variações de PPrel das DOEs (valores normalizados), mensuradas a cada meia hora ao longo de um período de cinco horas. Controle indica os resultados de PP rel mensurados em um aquário contendo água padrão (não poluída), e os valores de porcentagem indicam as diferentes concentrações de água poluída nos tratamentos experimentais.

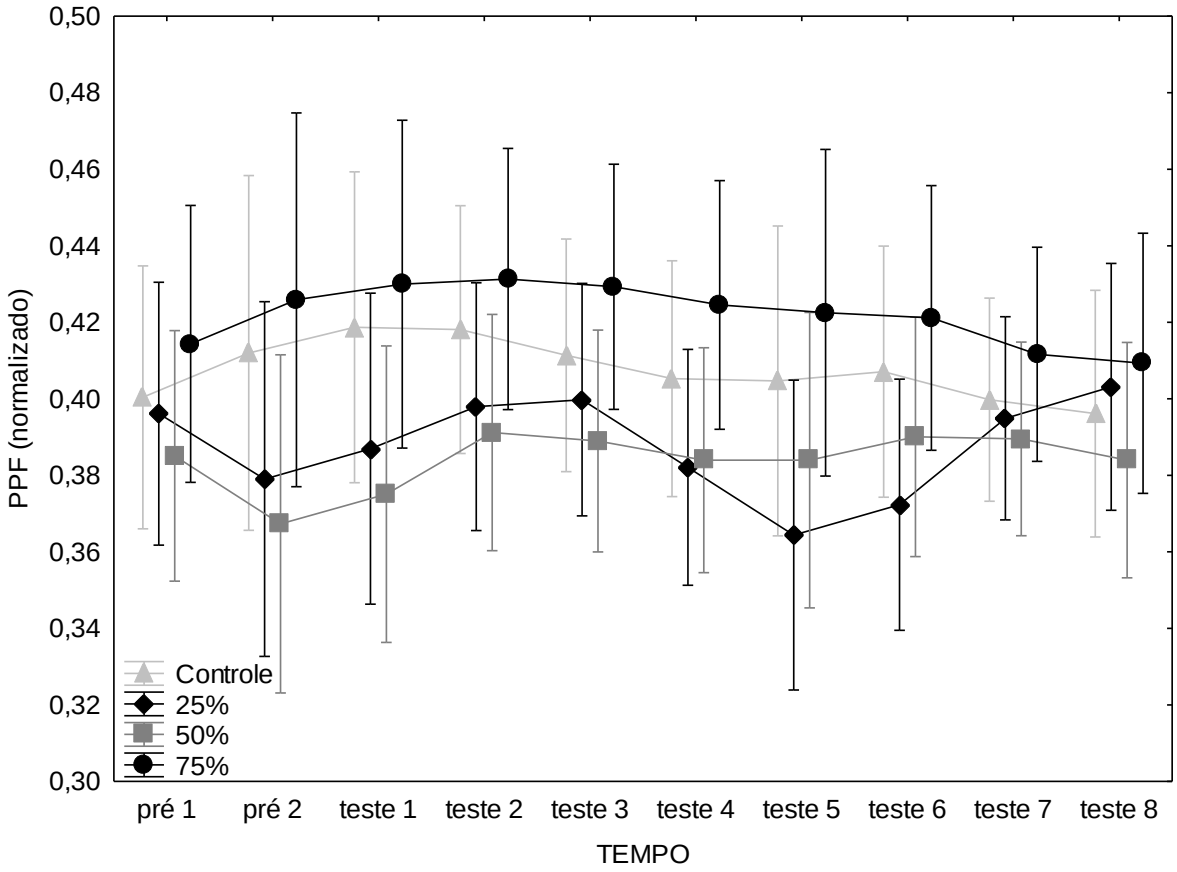

Figura 8. Representação gráfica das variações de PPF das DOEs (valores normalizados), mensuradas a cada meia hora ao longo de um período de cinco horas. Controle indica os resultados de PPF mensurados em um aquário contendo água padrão (não poluída), e os valores de porcentagem indicam as diferentes concentrações de água poluída nos tratamentos experimentais.

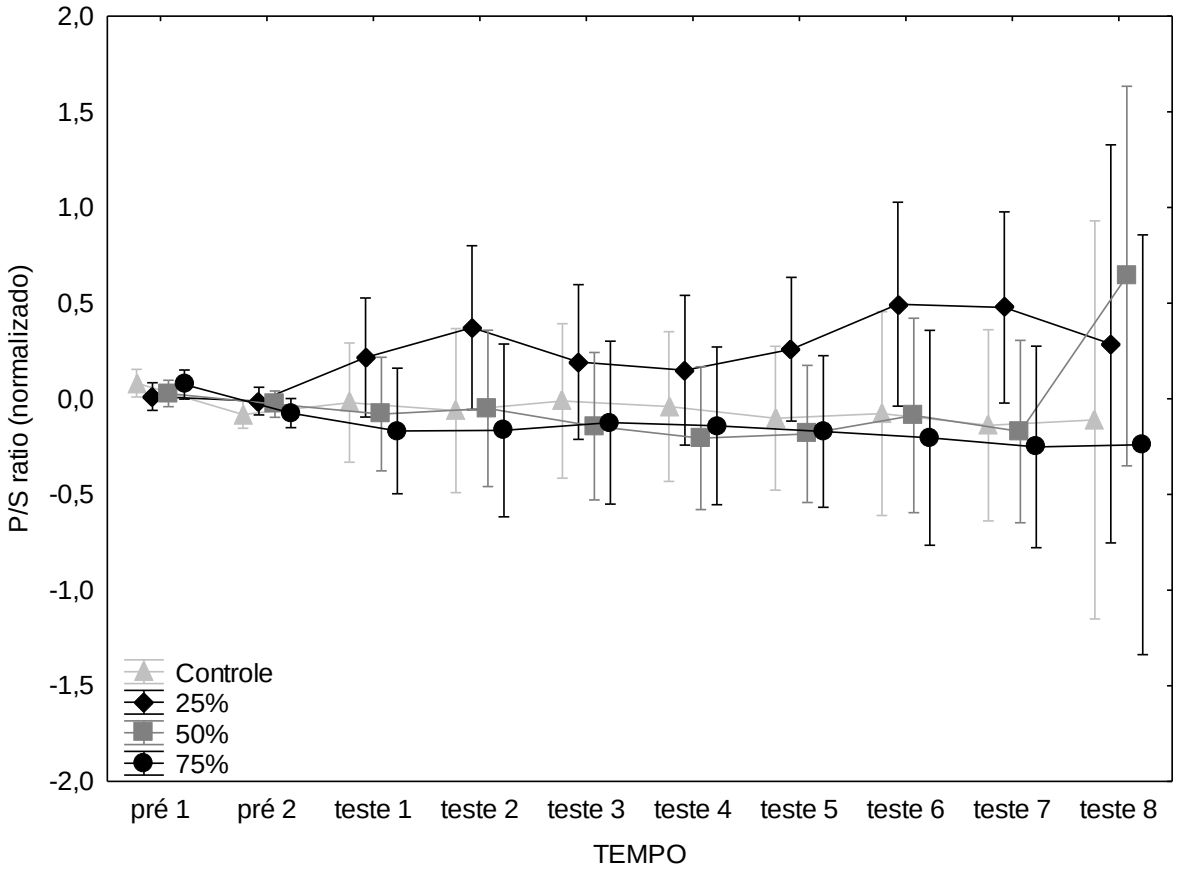

Figura 9. Representação gráfica das variações no P/S ratio (valores normalizados), mensuradas a cada meia hora ao longo de um período de cinco horas. Controle indica os resultados de P/S ratio mensurados em um aquário contendo água padrão (não poluída), e os valores de porcentagem indicam as diferentes concentrações de água poluída nos tratamentos experimentais.

5. Discussão

Inicialmente, é necessário mencionar que nossos resultados de taxonomia molecular indicam que uma nova espécie de *Microsternarchus*, ainda não descrita, foi utilizada neste estudo. Como este aspecto não fez parte dos objetivos principais do presente trabalho, os resultados de distância genética e uma breve discussão sobre o assunto foram inseridos como um anexo da presente dissertação. Contudo, ainda que a espécie utilizada neste trabalho não esteja formalmente descrita e a diversidade taxonômica do gênero *Microsternachus* ainda esteja mal conhecida, a fisiologia de espécies proximamente relacionadas, como as diferentes linhagens de *Microsternachus*, devem ser semelhantes, possibilitando os resultados deste estudo serem expandidos para outras espécies/linhagens próximas.

Muitos igarapés estão sob constante impacto de efluentes urbanos em Manaus. O trabalho realizado por Santos *et. al.* (2006) avaliou a qualidade da água de dois afluentes do rio Tarumã, os igarapés Bolívia e Matrinxã, que foi utilizado no presente trabalho. Os autores constataram que há alterações consideráveis nas características químicas, especialmente em NH_4^+, Ni, Pb, Cu e Zn, quando comparados às águas naturais da região. A condutividade elétrica, dureza, alcalinidade, PO_4^{3-}, NH_4^+, K^+, Na^+, Ca_2^+, Fe_3^+ e Mg^+ foram os parâmetros que melhor caracterizaram as águas desses igarapés. Os resultados de Santos *et. al.* (2006) também indicam que a qualidade da água nesses igarapés tende a ser um pouco melhor no início do período das chuvas no igarapé da Bolívia.

Outro estudo, realizado por Oliveira (2009), avaliou a influência do aterro sanitário de Manaus sobre as águas superficiais de igarapés da circunvizinhança, entre eles o igarapé Matrinxã, com enfoque na presença de metais pesados (Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn). Os autores destacam o grande aporte de poluentes que são lixiviados para este corpo d'água.

No presente estudo evidenciamos que a água poluída proveniente do igarapé Matrinxã, adicionada em diferentes diluições a uma água padrão de boa qualidade, produz alterações significativas na DOE do peixe elétrico *Microsternarchus* sp. Os efeitos variaram segundo a concentração de água poluída e ao longo do tempo de exposição aos poluentes. A frequência de descarga do órgão elétrico foi o parâmetro que apresentou variação mais conspícua e teve uma tendência forte de queda, que se mostrou tempo e dose-dependente. Parâmetros relacionados à forma da onda

não foram significativamente afetados, mas apresentaram algumas variações que serão discutidas adiante.

A frequência da DOE, ou taxa de repetição, reflete diretamente aspectos do metabolismo interno do peixe em relação a certos parâmetros ambientais. Estudos mostram uma fortíssima correlação entre a taxa de descarga e a temperatura da água (Thomas 1996, 1988; Ferreira 2008), e a relação entre temperatura e taxa metabólica de diversos grupos de organismos é bem estabelecida na literatura (Kochhann *et al.*, 2015). De fato, para todos os tratamentos com água poluída, houve um decréscimo da frequência das DOEs, e os tratamentos com os menores fatores de diluição produziram variações menores e/ou demoraram mais tempo para causar mudanças nesse parâmetro. Estes resultados corroboram a hipótese que a água poluída altera a DOE de *Microsternarchus* sp., e que esse efeito tanto depende da dose como do tempo de exposição. Tais evidências reforçam a ideia de que *Microsternarchus* pode, de fato, ser usado como um biossensor em um sistema de biomonitoramento ambiental. A sensibilidade aos efeitos da água poluída também contribui para explicar a ausência de espécies deste gênero em vários igarapés poluídos na área urbana de Manaus (obs. pessoais, dados não mostrados). Os possíveis efeitos de longo prazo da exposição à água poluída não foram examinados neste estudo, mas supõe-se, a partir dos dados coletados, que o efeito tende a se intensificar e afetar de forma grave o metabolismo do peixe, provavelmente levando à morte, caso o peixe não tenha a opção de abandonar o ambiente poluído.

Os resultados obtidos neste estudo também mostraram que o desvio padrão das medidas de frequência da DOE aumentou consideravelmente entre o pré-teste e o teste, mesmo para o controle (com adição de água padrão). Este efeito parece estar relacionado com o distúrbio mecânico da adição da água (poluída ou não) no aquário experimental, pois os valores do desvio padrão não se alteraram entre o pré-teste e o teste no experimento onde não houve adição de água no aquário experimental (Anexo, Figura 10). Este possível efeito de perturbação mecânica sobre a DOE nunca havia sido verificado antes, talvez porque nenhum experimento com *Microsternarchus* usou o sistema de diluição empregado neste estudo. Um aumento similar da instabilidade (e do desvio padrão) também foi observado para as variáveis PPrel e P/S ratio, e menos para PPF. Esses resultados sugerem que, além de um efeito fisiológico e/ou bioquímico dos poluentes na água, os possíveis efeitos

de distúrbios mecânicos devem ser levados em consideração e controlados em experimentos futuros.

O repentino aumento de frequência da DOE está relatado no trabalho desenvolvido por Post & Emde (1999). Esses autores testaram efeitos instantâneos de variações sonoras, de luminosidade, e dos dois fatores ao mesmo tempo, e observaram aumento repentino da frequência da DOE em *Gnathonemus petersii*, uma espécie de peixe elétrico africano (Mormyriformes). Nas primeiras intervenções sobre o ambiente do peixe, os autores consideraram essa variação como “novelty response”, ou seja, uma resposta a um estímulo novo ou desconhecido. Na medida em que o tempo passa as variações tenderam a diminuir, e os autores interpretaram esse fato pode indicar um processo de habituação às intervenções experimentais. Este mesmo efeito pode ser observado no presente trabalho, com a alteração de alguns parâmetros após a diluição da água.

Os resultados obtidos para os parâmetros relacionados à forma da onda indicam que o efeito do tratamento 75% (água mais poluída) se aproxima dos resultados obtidos para o controle, enquanto que os tratamentos com diluições intermediárias (25% e 50%) provocam alterações mais bruscas nos dois parâmetros medidos (PP rel e PPF). Ainda que estes resultados, a princípio, pareçam incoerentes, o mesmo foi observado por Ferreira (2008, 2016), quando testou os efeitos de combustíveis derivados do petróleo em peixes Gymnotiformes. Para as concentrações maiores de poluentes, as mudanças nos parâmetros das DOEs foram menos notáveis, enquanto as concentrações menores causaram as maiores alterações. Este possível padrão de resposta não linear à concentração de poluentes pode indicar a existência de dois caminhos metabólicos distintos dos Gymnotiformes, para lidar com situações fisiologicamente estressantes. É possível que, para concentrações mais elevadas, algum tipo de mecanismo compensatório interno entre em ação. A existência deste mecanismo de ação pode razão do PP rel (na concentração de poluentes de 75%) ter uma tendência a apresentar valores positivos, enquanto as concentrações de 25% e 50% mostraram uma tendência a apresentar valores negativos, especialmente na primeira hora e meia do teste. Isto significa que, para concentrações maiores, a fase positiva da DOE fica proporcionalmente maior, ou seja, ocorre uma alteração da forma da onda. Uma resposta similar, mas mais sutil, foi observada para o PPF. Neste caso, na primeira hora e meia de exposição, os valores de PPF tenderam a diminuir para as

concentrações de 25 e 50% quando comparados ao controle, mas ficaram acima da média para a concentração de 75%.

Se os experimentos deste estudo se estendessem por mais tempo, talvez as maiores concentrações de poluentes causassem alterações maiores aos peixes, mas tal possibilidade não foi testada. O indício nesta direção é que, pelo menos para os valores de P/S ratio, os desvios padrões das médias, para todas as concentrações, foram maiores na última hora do experimento, indicando um aumento da instabilidade no padrão das DOEs. Todos os parâmetros relacionados a forma da DOE (PP rel, PPF e P/S ratio) são passíveis de discussão, porém nas análises par a par (*Bonferroni*) não ocorreu variações significativas

Trabalhos que avaliaram efeitos da temperatura sobre a DOE, realizados por Thomas *et. a*l. (1996) e Pimentel (1988, *apud*. Clausen 2012), mostraram que houve variações significativas na frequência, mas nenhuma alteração foi encontrada para a forma da descarga. De forma similar, nenhum efeito da temperatura sobre a forma de onda foi observado para uma faixa de variação de 22-32◦C em *Apteronotus albifrons* (Thomas *et. al.*1996, 1988). Nos testes com Cianeto (Thomas et. al., 1996) foram observadas variações na forma da DOE a partir da segunda hora de exposição, contudo, as variações da frequência ocorreram em 30 minutos.

Vários aspectos do comportamento ou respostas fisiológicas de peixes elétricos têm sido estudadas, visando ao uso desses peixes em sistemas de monitoramento da qualidade da água em tempo real (Kay & Lewis, 1993; Thomas *et. al.*, 1996, 1988; Alves-Gomes *et. al.*, 2004; Schwernter, 2005; 2011; Rossoni, 2005; Ferreira, 2008, 2016; Clausen *et. al.* 2012). Em todos esses estudos, sensores mecânicos e/ou eletrossensíveis devem responder a um estímulo. Peixes elétricos Gymnotiformes têm características favoráveis para este tipo de teste, uma vez que é relativamente fácil registrar as suas respostas fisiológicas por meio de equipamentos simples. Outro ponto positivo é a possibilidade de testar o tempo que o poluente ou um complexo de substâncias demoram para modificarem os padrões de DOE desses peixes. Mesmo que vários estudos já tenham sido feitos demonstrando a correlação entre a frequência da DOE e a qualidade da água circundante, os mecanismos fisiológicos envolvidos nos processos de variações das DOEs ainda são desconhecidos.

Pelos resultados acumulados até momento, espécies de *Microsternarchus* tem se mostrado um modelo biológico importante, com potencial de ser utilizado

tanto para detecção de poluentes na água (biomonitoramento) como também para testes de bioensaios. É possível empregar esses peixes em experimentos tanto com drogas atuantes no sistema nervoso central como no sistema muscular, uma vez que o órgão elétrico tem origem embrionária em células musculares (Kirschbaum & Schwassmann, 2008). Trabalhos realizados por Ferreira (2006) testando efeitos da temperatura e derivados de combustíveis fosseis (Ferreira, 2008) nos padrões de DOE de *Microsternarchus* sp. evidenciaram redução na frequência na descarga dos indivíduos expostos aos poluentes a partir da segunda hora de exposição.

Nogueira (2008) analisou o repertorio eletrocomunicativo relacionado ao comportamento reprodutivo de *Microsternarchus* sp. em cativeiro e em 2011 avaliou comportamento agonístico em cativeiro. Petersen (2013) avaliou as variações na DOE de *Microsternarchus* sp. submetido a diferentes tipos de sinais interferentes. Esses estudos auxiliam no entendimento do comportamento das diferentes espécies e linhagens do gênero *Microsternarchus*. Com todo este acervo sendo formado sobre aspectos comportamentais e fisiológicos de peixes elétricos do gênero *Microsternachus,* o mesmo torna-se um potencial biomonitor para ser utilizado em protótipos de sistemas de monitoramento ambiental utilizando biossensores, idealizados pela equipe do LFCE/INPA.

Os resultados deste trabalho, além de contribuírem para a possibilidade de utilização de peixes Gymnotiformes como biomonitores, também demonstram como poluentes de origem urbana afetam o sistema eletrogênico/eletrossensório de *Microsternarchus* sp. e de outros peixes elétricos. A presença desses poluentes na água pode afetar, por exemplo, a capacidade de eletrolocalização, forrageamento, busca de parceiros reprodutivos e comunicação intraespecífica, restringindo a presença de peixes elétricos em igarapés poluídos. Isto pode explicar, ao menos potencialmente, as tentativas frustradas de coleta de peixes Gymnotiformes em igarapés poluídos na área urbana de Manaus, pela equipe do LFCE/INPA.

6. Conclusões

- A água do igarapé Matrinxã, poluída por efluentes urbanos, alterou a frequência de descarga do órgão elétrico de *Microsternarchus* sp., mas

não modificou significativamente a forma da DOE, em 4 horas de exposição.

- *Microsternarchus* sp. mostrou-se sensível a mudanças na qualidade da água, o que o habilita para ser utilizado em testes como biossensores e, potencialmente, como indicadores de integridade ambiental de igarapés amazônicos.

6. Referências bibliográficas

Andrade A. H. 2016. *Influência do método de amostragem nas estimativas de detecção e ocupação de peixes elétricos (Gymnotiformes) em igarapés da reserva Ducke, Amazônia central.* Dissertação (mestrado) --- INPA, Manaus,

Albert, J. S. 2000. Species diversity and phylogenetic systematics of American knifefishes (Gymnotiformes, Teleostei). Misc. Publ. *Mus. Zool. Univ. Michigan*, 190:1-127, 50 figs.

Alves-Gomes, J.A.; Ortí, G.; Haygood, M.; Meyer, M.; Heiligenberg, W. 1995. Phylogenetic analysis of the South American electric fishes (Order Gymnotiformes) and the evolution of their electrogenic system: A synthesis based on morphology, electrophysiology, and mitochondrial sequence data. *Mol Biol Evol*. 12(2): 298-318.

Alves-Gomes, J. A. 1997. Informações preliminares sobre a bio-ecologia de peixes elétricos (Ordem Gymnotiformes) em Roraima. In: Barbosa R. I.; Ferreira E. J. & Costellón E. G. (Eds.). *Homem, ambiente e Ecologia no Estado de Roraima. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia* (INPA), Manaus, AM.

Alves-Gomes, J. A. 2001. The evolution of electroreception and bioelectrogenesis in teleost fish: a phylogenetic perspective. *Journal of Fish Biology* 58, 1489–1511 doi:10.1006/jfbi.2001.1625.

Alves-Gomes, J. A. 2003. Indicadores biológicos como instrumentos da gestão ambiental In: 2°. *Simpósio Brasileiro de Engenharia Ambiental*, 2003, Itajaí-SC;

Alves-Gomes, J. A. et al. 2004. Notas sobre a potencial utilização de peixes elétricos como bioindicadores de qualidade de água. *In*: *Bioindicadores de qualidade de água*, Jaguariúna, São Paulo.

Alves-Gomes, J. A., 2014. Evolução e Fisiologia de Eletroceptores e Órgãos Elétricos e Peixes Neotropicais. *In.* Baldisserotto B.; Cyrino J. E; Urbinati E. C. (Orgs). *Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce.* Jaboticabal, FUNEP UNESP, 2014.

Anjos, H.D. B. *Efeitos da fragmentação florestal sobre as assembleias de peixes de igarapés da zona urbana de Manaus, Amazonas*. – 2007.101p. Dissertação de Mestrado – INPA/UFAM.

Bastian, J. 1994. Electrosensory organisms. *Physics Today*. American Institute of Physics. p. 30-37.

Bucker, A., C., W.; Alves-Gomes, J. A. 2006. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. *Acta Amazonica*. v.36, p.357 - 364, 2006.

Bullock, T. H. *et al.* 1979. Aspectos do uso da descarga do órgão elétrico e eletrorrecepção nos Gymnotidei e outros peixes amazônicos. *Acta Amazonica*, 9 (3): 549-572. 1979.

Bullock, T. H. *et al.* (editor). 2005. *Eletroreception*. *Springer Handbook os Auditory Research.*

California Academy of Sciences - Eschmeyer & Fong, no Catalog of Fishes http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp (2016).

Clausen J.; Wijk R. V.; Albrecht H. 2012. Weakly electric fish for biomonitoring water quality, *Environmental Technology*, 33:10, 10891099, DOI:10.1080/09593330.2011.6108

Couceiro, S.; Hamada N.; Luz, S. L. B.; Forsberg B. R.; Pimentel T. P. 2007 Deforestation and sewage effects on aquatic macroinvertebrates in urban streams in Manaus, Amazonas, Brazil. *Hydrobiologia.* 575:271–284 DOI 10.1007/s10750-006-0373-z

Cox-Fernandes, C.; Nogueira A.; Alves Gomes J. A. 2014. *Procerusternarchus pixuna*, a new genus and species of electric knifefish (Gymnotiformes: Hypopomidae, Microsternarchini) from the Negro River, South America. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia 163: 95-118.*

Cox Fernandes, C.; Nogueira A.; Williston A.; Alves Gomes J. A. 2015. A new species of electric knifefish from the rio Negro, Amazon basin (Gymnotiformes: Hypopomidae, Microsternarchini)

Crampton, W. G. R. & Albert, J. S. 2005. Evolution of electric signal diversity in Gymnotiform fishes. *In*: Ladich, F.; Collin, S. P.; Moller, P. & Kapoor, B. G. (Eds.). *Communication in Fishes*. Science Publishers Incorporation, New York, U.S.A., p. 641–725.

Dias M. S.; Magnussum W. E. & Zuanon J. A. S. 2009 Effects of Reduced-Impact Logging on Fish. *Conservation Biology*, Volume 24, No. 1, 278–286

Ferreira, D. J. 2008. *Utilização de* ***Microsternarchus bilineatus*** *como biomonitor: o efeito de combustíveis automotivos derivados do petróleo na descarga do órgão elétrico.* 2008. Dissertação de Mestrado (Biologia de Água Doce e Pesca Interior) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Ferreira D. J. 2016. *Efeito de combustíveis derivados do petróleo na descarga do órgão elétrico de* ***Parapterontus hasemani*** *(ellis 1913) (Ostariophysi, Gymnotiformes)* Tese de doutorado (Biologia de água doce e pesca interior) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

Ferreira S. J. F.; Miranda S. F.; Marques Filho A O. Silva C. C. 2012 Efeito da pressão antrópica sobre igarapés na Reserva Florestal Adolpho Ducke, área de floresta na Amazônia Central. vol. 42(4): 533 – 540. *Acta Amazonica.*

Forsberg, B. R. *et al.* Factors Controlling Nutrient Concentrations in Amazon Floodplain Lakes. 1988. *Limnology and Oceanography*, Vol. 33, No 1, 41-56.

Henderson, P.A. & Walker, I. 1986. On the leaf litter community of the Amazonian black water stream Tarumãzinho. *Journal of Tropical Ecology*. 2: 1-17.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2016. Resultados do Universo do Censo 2000: cidade de Manaus, AM. Internet: www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php.

Junk, W. J.; Soares, M.G. & Carvalho, F. M. 1983. Distribution of fish species in a lake of the Amazon River floodplain near Manaus (Lago Camaleão), with special reference to extreme oxygen conditions. *Amazoniana*, 7:397-431.

Kay A. N. & Lewis J. W. 1993. *Fish monitors and the role of electric fish as potential indicators of water quality*. J. Appl. Ichthyol. 9 (1993) 110-114. Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin ISSN 0175-8659.

Kirschbaum, F.; Schwassmann H.O. 2008. Ontogeny and evolution of electric organs in gymnotiform fish. *Journal of Physiology* - Paris 102 (2008) 347–356

Kochhann D.; Campos D. F.; Val A. L. 2015. Experimentally increased temperature and hypoxia affect stability of social hierarchy and metabolism of the Amazonian cichlid *Apistogramma agassizii*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part A 190 54–60

Lowe-Mcconnell, R. H. 1999. *Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais*. EDUSP, São Paulo. 536 p.

Maia, C.R. 2011. *Diferenciação genética e relações filogenéticas entre as linhagens de* ***Microsternarchus*** *(Gymnotiformes: Hypopomidae) na bacia do rio Negro, em função de marcadores moleculares mitocondriais e nucleares.* Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 73 pp.

Maia, C. R. & J. A. Alves-Gomes. 2012. Utilização do código de barras de dna na estimativa da diversidade de peixes elétricos do gênero *Microsternarchus* (Ostariophysi: Gymnotiformes) na bacia do Rio Negro, Amazonas. Pp 185-201. In: Souza, L. A. G. and E. G. Castellón (eds.). *Projeto Fronteira - desvendando as fronteiras do conhecimento na região Amazônica do Alto Rio Negro.* INPA, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação e Governo Federal Brasil, Manaus, Brazil.

Mago-Leccia, F. 1994. Eletric fishes of the continental water of America (Peces eléctricos de las águas continentales de America). *Biblioteca de La Academia de Ciências Físicas, Matematicas y Naturales.* v. 29, Caracas.221p.

Mendonça, F. *et al.* 2011. *Reserva Ducke: A biodiversidade amazônica através de uma grade* / Organizadores: Mario Luiz de Oliveira, Fabrício B. Baccaro, Ricardo Braga-Neto, Willian E. Magnusson. Manaus: Editora INPA. Pág. 63 a 75.

Meyer, J.L., Strayer, D.L., Wallace J.B., Eggert, S.L., Helfman, G.S. & Leonard, N.E. 2007. The contribution of headwater streams to biodiversity in river networks*. Journal of the American Water Resources Association*, 43 (1). DOI: 10.1111/j.1752-1688.2007.00008.x.

Nogueira, A.P.R. 2006. *Caracterização e análises do repertorio eletrocomunicativo de* ***Microsternarchus cf. billineatus*** *Fernéndez-Yepes, 1968 (Pisces: Gymnotiformes) durante a maturação sexual em cativeiro.* Dissertação de Mestrado,

Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/Universidade Federal da Amazônia, Manaus, Amazonas. 82 pp.

Nogueira, A.P.R. 2011. *Diversidade específica em* ***Microsternarchus*** *(Gymnotiformes: Hypopomidae) da bacia do rio Negro e comportamento agonístico em cativeiro de uma nova espécie do gênero.* Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 131pp.

Oliveira, J. A; Schor. T. 2008. Manaus: transformações e permanências, do forte a metrópole regional / *Cidades ribeirinha da Amazônia: mudanças e permanências.* Saint-Clair Cordeiro da Trindade Júnior e Maria Goretti da Costa Tavares (org.) EDUFPA.

Oliveira D. L. & Santana G. P. 2009. Influência do aterro municipal de Manaus sobre as águas superficiais da circunvizinhança: um enfoque ao estudo de metais pesados. *Caminhos de Geografia Uberlândia* v. 11, n. 34 jun/2010 p. 75 - 83 Página 75

Organização das Nações Unidas. Relatório Global Sobre Desenvolvimento e Água, (2012).

Pimentel-Souza, F. 1988. Electric organ discharge frequencies from two weakly electric gymnotiform fish exposed to carbono dioxide, conductivity and pH changes, Braz. J. *Med. Biol. Res.* 21, pp. 119–121.

Post, N. & Emde V. G. 1999. The “novelty response” in an electric fish: response properties and habituation. *Physiology & Behavior* 68. 115–128

Rossoni, D. M. & Alves-Gomes, J. A. 2004. Biomonitoramento de ambientes aquáticos através do campo elétrico gerado por *Apteronotus hasemani* (Apteronotidae - Gymnotiformes) e o efeito do pH em suas respostas bioelétricas In: *VIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia e Qualidade Ambiental*, Florianópolis-SC;

Rossoni, D. M. 2005. *A utilização das descargas dos órgãos elétricos de Apteronotus hasemani e* ***Apteronotus bonapartii*** *(Apteronotidae-Gymnotiformes) como bioindicadores em ambientes aquáticos.* Dissertação (Biologia (Ecologia)) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

Rossoni, D. M., Ferreira D., Schwertner G., Alves-Gomes, J. A. 2005. Electrifying diversity for conservation water resources In: ATBC Meeting 2005. Frontiers in Tropical Biology and Conservation, 2005, Uberlândia-MG. *Abstracts of the ATBC Meeting* 2005;

Santos, I. N.; Horbe, A.M.C.; Silva M. S. R.; Fonseca S. A. 2006 Influência de um aterro sanitário e de efluentes domésticos nas águas superficiais do Rio Tarumã e afluentes – AM VOL. 36(2): 229 – 236 *Acta Amazonica*.

Schwernter, G. 2005. ***Apteronotidae*** *(Pisces: Gymnotiformes) como modelo de bioindicador para compostos BTX.* 2005. Dissertação (Biologia de Água Doce e Pesca Interior) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

Schwertner G. 2011. *Sensoriamento ambiental com Gymnotiformes (Pisces).* 2011. Tese de doutorado (Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

Sioli, H. 1984. The Amazon and its main affluents: hydrography, morphology of the river courses, and river types, pp. 127-165. In: Sioli, H. & Junk, W. (Ed.). *The Amazon: limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and itsbasin. Publ.* Dordrecht.

Silva, C. P. D. 1992. *Influência das modificações ambientais sobre a comunidade de peixes de um igarapé da cidade de Manaus (Amazonas)*. Dissertação de mestrado. INPA, Manaus. 112p.

Thomas M. *et al.* 1996*.* Real-Time Biomonitoring of Water Contamination by Cyanide Based on Analysis of the Continuous Electric Signal Emitted by a Tropical Fish: Apteronotus Albifrons. *War. Res. Vol.* 30, No. 12, pp. 3083-3091.

Thomas, M.; A. Florion, and D. Chretien. 1998. A new warning biomonitor using a weakly electric fish, ***Apteronotus albifrons*** (gymnotiformes), and the effect of temperature on the bioelectric responses, *Environ. Monit.* Assess. 51. pp. 605–620.

Vannote, R.L., Minshall, G.W., Cummins, K.W., Sedell, J.R. & Cushing, C.E. 1980. The river continuum concept. Canadian. *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 37: 130-138.

Vieira, D.B. E Shibatta, A.O. 2007. Peixes como indicadores da qualidade ambiental do ribeirão Esperança, município de Londrina, Paraná, Brasil. *Biota Neotropica*, Vol.7 números 1).

7. Anexos

Variação de frequência (Hz) diurno de *Microsternachus* sp.

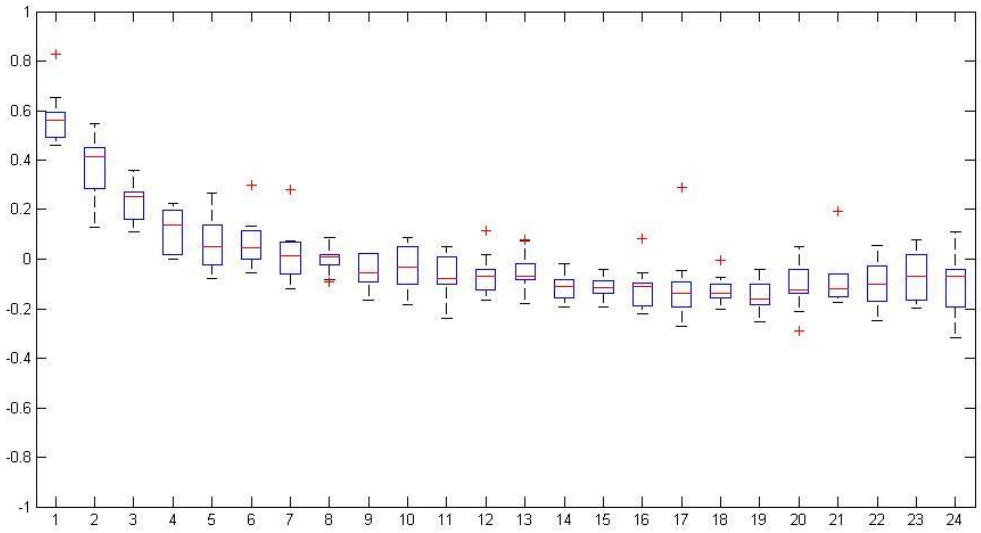

Figura 10. Box plot das observações (agrupadas em pares) dos experimentos de 12 horas realizados sem período de aclimatação e sem manipulação experimental.

Análise molecular

Com o objetivo de assegurar uma identificação taxonômica e sistemática adequada, dez espécimes utilizados no experimento foram submetidos a análise molecular com o objetivo de determinar a linhagem ou espécie que os peixes pertenciam. Esse procedimento foi necessário uma vez que estudos relativamente recentes (Maia e Alves Gomes 2012; Cox-Fernandes *et. al.* 2014; Cox-Fernandes *et.*

al. 2015) demonstram que o gênero *Microsternarchus* engloba um complexo de espécies, muitas ainda não descritas formalmente. A identificação foi feita utilizando-se o protocolo do código de barras de DNA (DNA barcode), ou seja, foi sequenciado um fragmento do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COI), que foi um dos marcadores utilizados por Maia (2012). O sequenciamento foi feito por alunos do LFCE, trabalhando no Laboratório Temático de Biologia Molecular do INPA, seguindo-se os protocolos padrão do DNA barcode

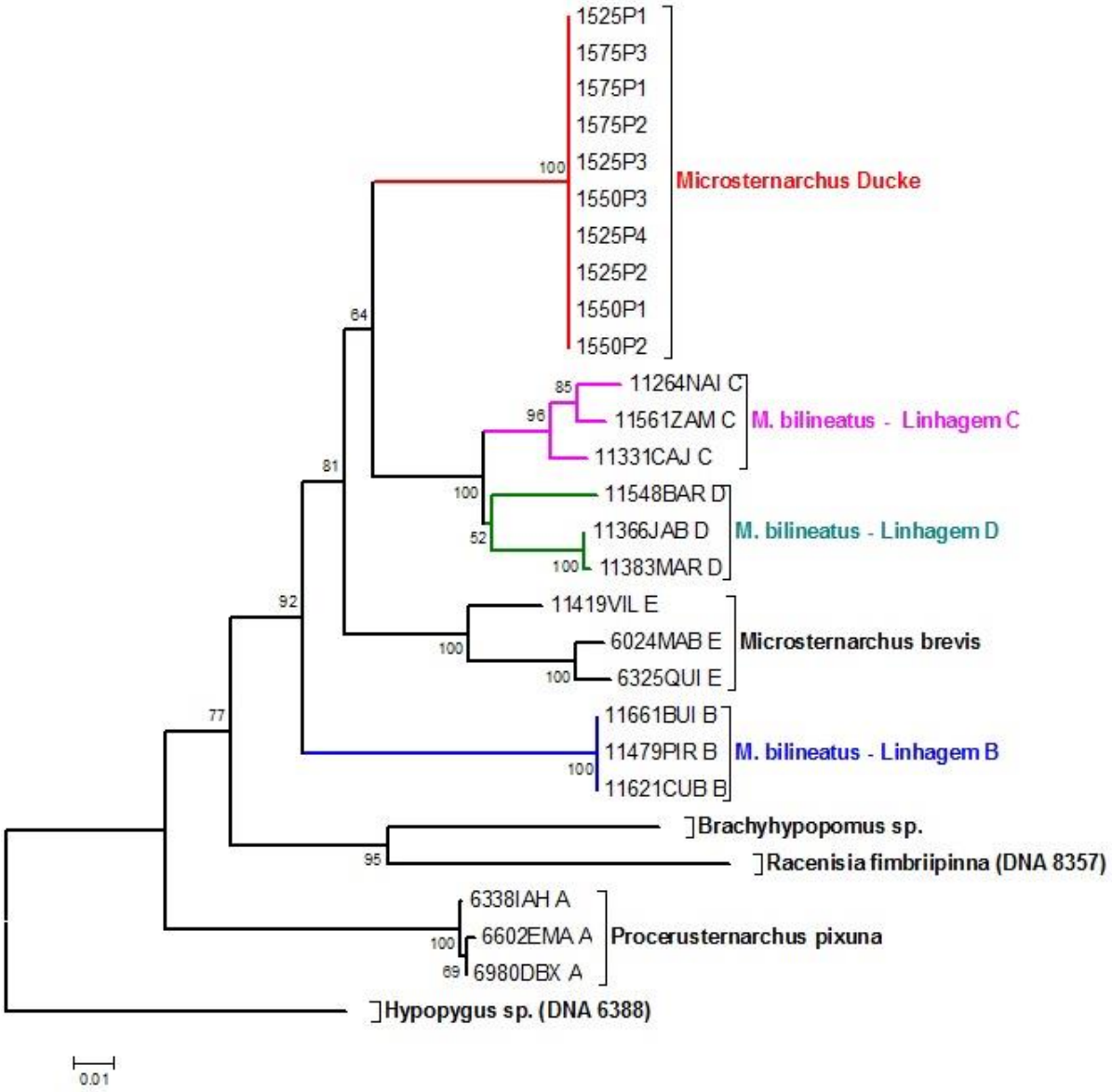

Figura 11. Árvore simplificada da família Hypopomidae (Arquivos LFCE).

Tabela 2: Distancia genética em porcentagem de diferentes espécies (e linhagens) de *Microsternarchus* e outros gêneros de hipopomydeos.

	Brachyhypopomus sp.	Hypopygus sp.	Racenisia	P. pixuna	M. brevis	Mb. Linha B	Mb. Linha C	Mb. Linha D
Brachyhypopomus sp.								
Hypopygus sp.	25.8							
Racenisia	15.0	23.6						
P. pixuna	20.6	19.5	20.1					
M. brevis	18.3	23.0	20.7	17.7				
Mb. Linha B	19.1	20.9	22.0	18.3	14.1			
Mb. Linha C	17.9	21.9	20.9	17.6	12.6	16.0		
Mb. Linha D	17.2	22.7	20.2	16.8	13.2	14.3	5.6	
M. Ducke	19.6	22.7	21.0	17.4	10.8	13.3	10.3	10.2

Tabela 2: Resultados da análise molecular utilizando as linhagens e espécies próximas

Com base nos resultados da análise molecular e nos padrões de descarga é possível dizer que a espécie utilizada provavelmente seja uma espécie nova. As diferenças na tabela em porcentagem mostram que existe maior variação molecular da espécie utilizada em comparação com as espécies já descritas por Cox Fernandes *et. al.* (2014, 2015).

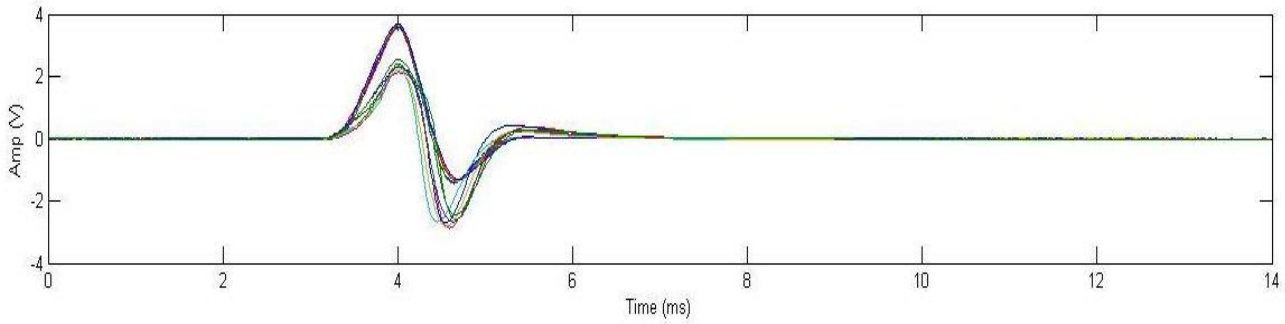

Figura 12. Imagem comparativa entre DOEs de *Microsternachus*. As DOEs que apresentam fase negativa menor são dos peixes que foram os utilizados neste trabalho. O grupo que apresenta fases positiva e negativa de tamanho aproximado são descargas dos peixes utilizados por Petersen (Arquivos LFCE).