

**CULTIVO DO PEIXE *Danio rerio* EM CONDIÇÕES LABORATORIAIS  
VISANDO À OBTENÇÃO DE EMBRIÕES E LARVAS PARA USO EM ENSAIOS  
ECOTOXICOLÓGICOS AGUDO (FET TEST) E CRÔNICO DE CURTA DURAÇÃO \***

Nathalia Fonseca BOIANI <sup>1,6</sup>; Fernanda Lie IKARI <sup>2,6</sup>; Thaynan Cristina PIETRO <sup>2,6</sup>;  
Felipe von Atzingen Pereira de ARAÚJO <sup>1,6</sup>; Eduardo de Medeiros FERRAZ <sup>4,6</sup>;  
Sueli Ivone BORRELY <sup>5</sup>; Cíntia BADARÓ-PEDROSO <sup>3,6</sup>

<sup>1</sup> Bolsista PIBIC/CNPq/IP. e-mail: naty\_boiani@hotmail.com

<sup>2</sup> Estagiária do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Peixes Ornamentais (CPDPO) - Instituto de Pesca - SP

<sup>3</sup> Orientadora - Pesquisadora Científica do CPDPO - Instituto de Pesca. e-mail: pedrosos@pesca.sp.gov.br

<sup>4</sup> Co-orientador - Pesquisador Científico do CPDPO - Instituto de Pesca

<sup>5</sup> Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN, São Paulo

<sup>6</sup> Endereço/Address: Instituto de Pesca - APTA - SAA - SP

Av. Francisco Matarazzo, 455 - São Paulo - SP - Brasil - CP: 61070 - CEP: 05001-970

\* Apoio financeiro: Bolsa de Iniciação Científica, Programa PIBIC/CNPq/Instituto de Pesca

**Palavras-chave:** *Danio rerio*; paulistinha; procedimento de cultivo; ecotoxicologia aquática; ensaio agudo com embrião de peixe.

## INTRODUÇÃO

No Brasil, ensaios ecotoxicológicos com peixes, padronizados pela Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT, estão restritos às espécies *Danio rerio* e *Pimephales promelas*, para avaliar toxicidade aguda e crônica de curta duração, em exposições de 48 e 168 h, respectivamente (ABNT, 2004; 2007). A grande maioria dos laboratórios prestadores de serviços na área de ecotoxicologia aquática adquire os peixes adultos para uso em ensaios agudos, de produtores comerciais particulares e lojas de aquarismo, e as larvas recém-eclodidas para uso em ensaios crônicos de 168 h são de difícil obtenção. Como consequência, os laboratórios que executam o ensaio crônico de curta duração ainda são poucos. Desde 2005, na Alemanha e em outros países europeus, uma modalidade do ensaio de toxicidade aguda com peixe, o teste com embriões ou ovos recém-fecundados (FET TEST) com 48 h de duração, substituiu o teste agudo com peixes adultos e tornou-se obrigatório para o monitoramento de efluentes (BRAUNBECK e LAMMER, 2006). Portanto, o cenário atual indica uma demanda por larvas recém-eclodidas que não tem sido atendida, e futuramente a necessidade de embriões recém-formados, justificando-se assim o investimento no procedimento de cultivo do peixe *Danio rerio* no laboratório do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Peixes Ornamentais do Instituto de Pesca.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para a indução da desova de *Danio rerio* seguiram-se os procedimentos descritos na norma da ABNT (2007), com modificações. Machos e fêmeas adultos foram mantidos separados por no mínimo sete dias antes do acasalamento, durante os quais foram alimentados duas vezes ao dia (*ad libitum*) com náuplios recém-eclodidos e adultos de *Artemia* sp e ração para peixe. Utilizou-se a proporção de dois machos para uma fêmea e/ou um macho para uma fêmea. No interior dos aquários, de 40 litros, foram colocadas cestas de plástico costuradas com rede de malha com abertura de 2 mm, sustentadas 20 cm acima do fundo. A temperatura foi mantida a  $25 \pm 1$  °C com auxílio de termostato, o fotoperíodo foi natural, e manteve-se aeração forte. A análise de pH e amônia da água desclorada da rede pública de abastecimento foi feita com testes colorimétricos.

Após a desova, os ovos foram transferidos para placas de "Petri" e contados a olho nu, separando-os com auxílio de pincel em fecundados e não fecundados. A seguir, foram recontados sob lupa, separando-os em três grupos: fecundados (transparentes e brilhantes) e não fecundados coagulados e infestados por fungos. Os ovos fecundados foram transferidos para incubadoras em aquários de sete litros com aeração forte.

As larvas foram mantidas em tubos de PVC telados no fundo, com diâmetro de 12 cm, em aquários com 3,5 litros de água desclorada da rede de abastecimento público e aeração forte. A água dos aquários foi trocada diariamente. O fotoperíodo e a temperatura foram naturais. As larvas não foram alimentadas até o 6º dia de vida, pois apresentavam saco vitelínico. No 7º dia de vida (168 h) foram alimentadas com ração para alevinos (marca "Alcon"), após maceramento.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De onze combinações feitas entre machos e fêmeas maduros de *Danio rerio* para o acasalamento, foram obtidas quatro desovas. A temperatura variou de 25 a 30 °C e o pH, de 7,2 a 7,5. O valor médio da desova foi de 226 ovos por fêmea, com amplitude de 79 a 345 ovos. Segundo a ABNT (2007), as fêmeas de *Danio rerio* produzem em média 300 ovos durante a desova, dos quais cerca de 70 a 90% são viáveis. Entretanto, no manual da OECD (2006) é reportado o valor de 50 a 80 ovos por dia por fêmea, e ADU e THONSEM (2011) informam um valor de 200 ovos por desova. Portanto os valores obtidos no presente trabalho estão dentro da faixa informada pela ABNT (2007), OECD (2006) e ADU e THONSEM (2011).

Em relação à porcentagem de ovos fecundados, os valores obtidos foram elevados em três das desovas, entre 85 a 97%, e em uma delas esta taxa foi de 16%.

Quando se verificou a viabilidade do uso de ovos fecundados em ensaios agudos de 48 h com embriões e de 168 h com larvas recém-eclodidas, observaram-se valores médios de 98% e 14% de embriões saudáveis, após 24 e 48 h respectivamente, em duas desovas ocorridas em dezembro de 2012, enquanto, nas desovas de fevereiro de 2013, os valores médios foram de 95 e 94% de embriões saudáveis, após 24 e 48 h respectivamente (Tabela 1).

Nas desovas de dezembro de 2012 houve mortalidade elevada de embriões após 48 h, no entanto nas desovas de fevereiro de 2013 obteve-se o valor médio de 62% de larvas vivas após sete dias (168 h) de vida (Tabela 1).

**Tabela 1.** Produção de ovos, embriões e larvas de *D. rerio* em condições de temperatura entre 25 e 28 °C e pH entre 7,2 e 7,5.

Data desova	Proporção macho: fêmea	Total de ovos	Ovos fecundados	Ovos não fecundados		Embriões viáveis (%)		Larvas viáveis (%)
				coagulados	fungados	24h	48h	
18/12/2012	1♂: 1♀	225	219	06	0	100	7	0
19/12/2012	2♂: 1♀	79	72	0	07	97	22	0
20/02/2013	1♂: 1♀	254	42	09	203	95	95	55
20/02/2013	2♂: 1♀	345	293	09	43	95	94	69

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostram que o procedimento para obtenção de embriões e larvas para uso nos dois tipos de ensaios é exequível, mas ainda necessita de melhorias para o aumento da produtividade.

## REFERÊNCIAS

- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). 2004 *Ecotoxicologia aquática – toxicidade aguda – método de ensaio com peixes*. ABNT, NBR 15088.
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). 2007 *Ecotoxicologia aquática – toxicidade crônica de curta duração – método de ensaio com peixes*. ABNT, NBR 15499.
- BRAUNBECK, T. e LAMMER, E. 2006 *Fish Embryo Toxicity Assays*. German Federal Environment Agency. UBA contract number 20385422.
- OECD 2006 GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS. *Draft Proposal for a New Guideline Fish Embryo Toxicity (FET) Test*.
- ADU, R.O. e THOMSEN, J.P. 2011 Improving Production of Zebra Fish Embryos in the Lab. *Journal of Environmental Protection*, 2: 1360-1363.