



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia  
Coordenação de Capacitação  
Divisão Apoio Técnico

**PIBIC**

**2.308**

PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO INPA  
RELATÓRIO FINAL

**EFEITO DOS CENÁRIOS CLIMÁTICOS PREVISTOS PARA O ANO DE 2100  
SOBRE O COMPROMISSO OSMORREPIRATÓRIO EM *Pyrrhulina aff brevis***

**BOLSISTA:** Jefferson de Almeida Silva

**ORIENTADORA:** Dra. Vera Maria Fonseca de Almeida e Val

**COORIENTADOR:** Msc. Derek Felipe de Campos

Relatório Final apresentado ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como requisito para a conclusão como participante do Programa de Iniciação Científica do INPA.

Manaus – Amazonas  
2017

Apoio Financeiro:



Realização:



MINISTÉRIO DA  
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,  
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES





## **Título Trabalho do Bolsista: EFEITO DOS CENÁRIOS CLIMÁTICOS PREVISTOS PARA O ANO DE 2100 SOBRE O COMPROMISSO OSMORREPIRATÓRIO EM *Pyrrhulina aff brevis***

### **Resumo (250 a 400 palavras)**

O compromisso osmorespiratório em peixes é o conflito entre a troca de gases respiratórios e a manutenção do equilíbrio osmótico. Aumento nas concentrações de CO<sub>2</sub> e, conseqüentemente, da temperatura devido às alterações climáticas estão previstos e poderão perturbar este equilíbrio. Entender as respostas fisiológicas de *Pyrrhulina aff brevis* em meio aos cenários climáticos propostos pelo IPCC (2007) para os próximos 100 anos é de fundamental importância para a compreensão dos mecanismos de adaptação que podem ajudar na sobrevivência desta espécie. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos dos cenários climáticos previstos para o ano de 2100 pelo IPCC sobre o compromisso osmorespiratório de *Pyrrhulina aff brevis*; avaliando a taxa de consumo de oxigênio, a regulação iônica e o papel das enzimas Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase e H<sup>+</sup>-ATPase frente aos cenários climáticos. Os indivíduos de *Pyrrhulina aff brevis* foram expostos durante 15 dias aos cenários climáticos simulados em microcosmos, nas três salas onde há o controle da temperatura, CO<sub>2</sub>, luminosidade e umidade do ar. Duas salas foram utilizadas, as quais simulam os cenários climáticos previstos pelo IPCC (2007): moderado (A1B: +2.5 °C e + 400 ppm CO<sub>2</sub>) e extremo (A2: +4 °C e +850 ppm CO<sub>2</sub>), além da sala “controle” que representa o cenário atual. A exposição aos cenários mostrou aumento na taxa metabólica (MO<sub>2</sub>) nos animais aclimatados nos cenários (A1B e A2) em relação ao cenário controle. Estas respostas mostram um típico efeito da temperatura sobre a demanda energética em relação ao aumento da temperatura e CO<sub>2</sub>. Nossos dados mostraram, também que a redução da taxa entre a capacidade do sistema de transporte de elétrons (ETS) e o consumo de O<sub>2</sub> (MO<sub>2</sub>), ou seja, da reserva energética disponível para a realização das atividades biológicas, bem como o aumento dos níveis de lactato nos tecidos dos animais dos cenários A1B e A2 implicarão em perda da capacidade de contração muscular. Além disso, ocorreu uma grande excreção de amônia nos cenários A1B e A2, indicando a necessidade da utilização da oxidação de proteínas como substrato energético. Embora não haja alteração na atividade da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase, notou-se um aumento na H<sup>+</sup>-ATPase, mostrando uma desregulação no balanço ácido-base.



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia  
Coordenação de Capacitação  
Divisão Apoio Técnico

Tais ajustes nos níveis metabólicos mostram um claro desbalanço no compromisso respiratório com implicações diretas na fisiologia de *Pyrrhulina aff brevis*, que poderá implicar em desafios para a sobrevivência, crescimento, distribuição e reprodução frente às mudanças ambientais previstas para o ano de 2100.

**Palavras Chave:** osmorrespiração, mudanças climáticas, Amazônia Central, *Pyrrhulina aff brevis*.

**Subárea:** Multidisciplinar

**Financiamento**

(PIBIC/CNPq)

Data: 18 / 09 / 2017

Orientador(a)

Vera M. F. Almeida - Val, Dra.  
INPA - LEEM  
Av. André Araújo, 2936 - Petrópolis  
CEP: 69067-375 - Manaus - AM - Brasil

Bolsista

Apoio Financeiro:



Realização:



MINISTÉRIO DA  
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,  
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES



## INTRODUÇÃO

Peixes de água doce são hiperosmóticos em relação ao seu meio externo; como consequência, a água tende a passar pela superfície branquial por diferença de gradiente de concentração em um processo conhecido como osmose, deste modo ocorrendo à diluição das soluções do corpo do animal (Gonzalez e MacDonald 1992). Para compensar tal desequilíbrio osmótico, a superfície epitelial das brânquias dos peixes é responsável pela absorção ativa dos sais que estão diluídos na água; esse transporte ocorre contra o gradiente de concentração, indo da menor para a maior concentração de sais e, por isso, não ocorre espontaneamente. Há, portanto, um gasto de energia na forma de ATP. Esses mecanismos funcionais das brânquias refletem os ajustes bioquímicos e fisiológicos ao longo da história de vida das espécies em resposta às diferentes pressões do ambiente aquático a fim de manter a homeostase. Portanto, alterações que perturbem os equilíbrios osmóticos são energeticamente custosas. (Hochachka e Somero 2002).

Uma das principais responsáveis pela manutenção da concentração iônica é a enzima  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase; esta proteína transmembranar atua degradando o ATP em ADP e fosfato inorgânico, para que a troca iônica possa ocorrer, ou seja, ela é responsável pela troca dos íons de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  contra os gradientes de concentração na superfície branquial (Brusca e Brusca 2007). Outra importante enzima da regulação iônica é a  $\text{H}^+$ -ATPase que desempenha um papel importante no balanço ácido-básico de peixes, realizando o transporte de água e  $\text{CO}_2$  através das brânquias, onde ocorre a catalisação de  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  em ácido carbônico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ), que acaba por se dissociar espontaneamente em Prótons ( $\text{H}^+$ ) e íons de bicarbonato, além de regular as concentrações de dióxido de carbono presentes no sangue do animal.

Ao mesmo tempo em que as brânquias dos peixes desempenham papel central na regulação iônica, balanço ácido-base e excreção de compostos nitrogenados (Brauner *et al.* 2011), estas também são responsáveis por garantir as trocas gasosas no processo de respiração. Condições benéficas às trocas gasosas, tais como aumento da área superficial, redução da distância de difusão e aumento no fluxo sanguíneo e de água, são características prejudiciais à osmorregulação, uma vez que facilitam o processo de perda de íons.

O compromisso osmorrespiratório em peixes é, portanto, um o conflito entre a troca de gases respiratórios e a regulação iônica, de tal forma que a perda de íons aumenta com o aumento da demanda pela troca de gases respiratórios em ambientes hipotônicos, tais como a água doce (Randall *et al.* 1972). O compromisso osmorrespiratório foi primeiramente descrito por Randall *et al.* (1972), que avaliou o aumento no fluxo de  $\text{Na}^+$  em *Oncorhynchus mykiss*, à medida que aumentava as necessidades energéticas para natação, ou sob o efeito de noradrenalina. Além de exercícios, estudos que investigam o compromisso osmorrespiratório têm sido realizados com outros fatores tais como hipóxia (Robertson *et al.* 2015), temperatura (Sardella *et al.* 2004), ou salinidade (Haney e Nordile 1997); no entanto, poucos estudos exploram efeitos conjuntos de diferentes variáveis ambientais sobre a fisiologia osmorrespiratória.

Os níveis atmosféricos de  $\text{CO}_2$  estão previstos para atingir valores entre 420 e 940 ppm até o final do século XXI, segundo relatórios do IPCC (IPCC 2013). Como o  $\text{CO}_2$  é um dos principais gases com efeito de estufa, o clima da Terra está projetado para aquecer, em média, entre 2,6 e 4,8 °C até o ano de 2100. O aquecimento das águas superficiais é uma das ameaças ambientais mais cruciais para os ectotermos, principalmente devido aos efeitos que a temperatura tem sobre os processos metabólicos sobre o suprimento de oxigênio e sobre as restrições resultantes nos sistemas ventilatório e circulatório (Pörtner e Knust 2007). Em conjunto com o aquecimento da temperatura, cerca de um terço do  $\text{CO}_2$  produzido pela queima de combustíveis fósseis foi absorvido pelas águas oceânicas desde a Revolução Industrial. O  $\text{CO}_2$  reage com a água, resultando em um aumento líquido das concentrações de  $\text{H}^+$  e  $\text{HCO}_3^-$ . Esse processo é denominado acidificação, o que levou a uma redução no pH da água da superfície do mar em 0,1 unidades desde a industrialização; assim, prevê-se uma acidificação dos oceanos de mais 0,14-0,42 unidades até o final deste século (Pörtner *et al.* 2014) e o mesmo é esperado para os ambientes dulcícolas.

Da mesma forma que a temperatura, altos níveis de  $\text{CO}_2$  exigem um aumento nas taxas metabólicas a fim de suprir as necessidades fisiológicas, tais como regulação ácido-base e aumento nas taxas de ventilação (Perry e Gilmour 2002; Evans *et al.* 2005; Perry e Gilmour 2006). Embora alguns trabalhos tenham demonstrado que os peixes são capazes de ajustar os íons relevantes na regulação ácido base ( $\text{HCO}_3^-$  e  $\text{Cl}^-$ ) para manter o pH do sangue e do tecido (Fabry *et al.* 2008), nenhum estudo foi realizado com peixes amazônicos, que habitam águas pobres em íons e com

pouca capacidade de tamponamento das soluções, sendo esperado, portanto, serem mais suscetíveis a esta acidificação.

A espécie *Pyrrhulina aff brevis*, pertencente à ordem Characiformes e à família Lebiasinidae, é uma espécie de peixe de pequeno porte medindo de 5 a 7 cm, que se distribui por uma variedade de habitats em pequenos igarapés de 1ª e 2ª ordem da Amazônia Central. Essa espécie é muitas vezes encontrada em poças adjacentes ao canal principal dos igarapés, que apresentam grande quantidade de matéria orgânica, a qual produz altas concentrações de CO<sub>2</sub> (Silva *et al.* 2016). Essa espécie é a mais abundante nos igarapés de 1ª e 2ª ordem; exercendo, deste modo, função fundamental na manutenção da estrutura e da ecologia desses ambientes (Mendonça *et al.* 2005). Além disso, tem importante relevância econômica, principalmente o macho, por ser mais colorido, possuindo um potencial no mercado internacional de peixes ornamentais, alcançando o valor de US\$ 40,00 para cada caixa exportada com 100 indivíduos (Prang 2008). A diminuição na precipitação e o aumento da temperatura e CO<sub>2</sub>, decorrente das atuais mudanças climáticas, poderão restringir e alterar a distribuição desta espécie. Entender como estas alterações vão afetar o metabolismo desta espécie é, portanto, fundamental para programas de conservação e biomonitoramento desses ambientes. O presente estudo tem como objetivo investigar os efeitos dos cenários climáticos sobre o compromisso osmorespiratório, avaliando a taxa de consumo de oxigênio, a regulação iônica e o papel das enzimas Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase e H<sup>+</sup>-ATPase frente ao aumento da temperatura e CO<sub>2</sub>. Espera-se que, frente aos cenários climáticos extremos, ocorra um desbalanço osmorespiratório que comprometerá o desempenho desta espécie.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta e Manutenção

No total, 21 indivíduos da espécie *Pyrrhulina aff brevis* foram coletados na Reserva Florestal Adolfo Ducke. Os peixes foram coletados conforme o protocolo de Mendonça *et al.* (2005). Um trecho de 50 m do igarapé foi barrado com auxílio de redes de bloqueio. Dentro desta área dois coletores utilizaram puçás para coleta manual por cerca de uma hora. Além disso, poças adjacentes foram exploradas utilizando puçás. Os peixes coletados foram acondicionados em aquários de 20L e transportados para o Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM), onde foram acondicionados por 15 dias em tanques de 150L, com aeração constante, alimentação diária e troca parcial de 10% de água para evitar o acúmulo de resíduos de nitrogênio.

### 2.2 Aclimação aos cenários climáticos

A exposição aos modelos climáticos previstos pelo Relatório Especial sobre Cenários de Emissão (SRES) do IPCC (2007), foi realizada em salas experimentais onde os níveis de temperatura, CO<sub>2</sub>, umidade do ar e luminosidade são controlados. Nestas salas são simulados três cenários de mudanças climáticas previstos pelo IPCC (2007) para os próximos 100 anos: o cenário controle (temperatura e CO<sub>2</sub> atuais; Sala 1), o cenário moderado (+400ppm de CO<sub>2</sub> e aumento 2,5 °C; Sala 3), e extremo (+850ppm de CO<sub>2</sub> e aumento de 4,5 °C, Sala 4). Em cada sala 7 indivíduos de *P. aff brevis* foram distribuídos em três aquários de 20L (dois aquários com dois peixes cada e um com três peixes), aclimatados por 15 dias. No decorrer do experimento realizou-se a medição do oxigênio, pH e temperatura diariamente.

Após o período de aclimação, para verificar o compromisso osmorrespiratório, os peixes foram transferidos para câmaras individuais de 200 mL com aeração constante, onde foram medidas a taxa de consumo de oxigênio e a perda de íons por um período de 12 horas, método descrito a seguir; após este período os peixes foram anestesiados e eutanasiados por meio de atordoamento seguido de ruptura da medula espinal, como recomendado nas Diretrizes para ética no Uso de Animais do CONCEA. As brânquias foram retiradas para análise enzimática e o corpo para análise de ETS, Glicogênio e Lactato, como descrito a seguir.

### 2.2.1 Análise Respirométrica

A taxa de consumo de oxigênio foi mensurada através de um sistema de câmara fechado utilizando um aparelho automatizado controlado pelo sistema computacional DAQ-M (Sistemas Loligo, Tjeli, Dinamarca). A medição de oxigênio nas câmaras ocorreu por meio de sensores de fibra óptica conectados a oxímetros. Após os peixes serem colocados nas câmaras de 200ml, eles foram deixados por uma hora para recuperar do manuseio. Posteriormente, a taxa metabólica foi monitorada ao longo de um período de 10 min, 2 vezes em cada frasco plástico (vial) durante o período experimental. Neste período a aeração foi interrompida, para que fosse monitorada a diminuição na concentração de oxigênio dentro das câmaras, relacionado ao consumo de oxigênio. O consumo de oxigênio,  $MO_2$  ( $mg\ O_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ ), foi calculado como  $MO_2 = -\Delta O \cdot V_{resp} \cdot B^{-1}$ , onde  $\Delta O$  é a taxa de alteração na concentração de oxigênio ( $mgO_2 \cdot h^{-1}$ ),  $V_{resp}$  é o volume da câmara (200 ml) e  $B$  é a massa do indivíduo (kg).

### 2.2.2 Análise de Íons na água

Para mensurar o fluxo de amônia e íons na água, aproximadamente 10 mL de água de cada aquário foram coletados a cada 6 horas ao longo de todo o período experimental e as amostras foram congeladas a  $-20\ ^\circ C$ . Para as análises, alíquotas de água foram utilizadas para a leitura da concentração de amônia, realizadas conforme os ensaios colorimétricos (Verdouw *et al.* 1978) e os íons  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$ , por fotômetro de chama (AAAnalyst 800, PerkinElmer).

### 2.2.3 Atividade da $Na^+K^+ATPase$ e $H^+ATPase$

A atividade da  $Na^+K^+ATPase$  e  $H^+ATPase$  nas brânquias foi mensurada de acordo com o protocolo descrito por Kültz e Somero (1995). O ensaio é baseado na oxidação de NADH reduzido pela reação de enzima acoplada à hidrólise de ATP. As brânquias foram homogeneizadas 1:10 (massa/volume) em tampão SEID gelado (150 mM de sacarose, 50 mM de imidazol, 10 mM de EDTA, 0,5% Na-desoxicolato, pH 7,5). Os homogenados foram centrifugados ( $4\ ^\circ C$ , 2000x g) durante 10 min e o sobrenadante recolhido para executar o ensaio enzimático. O sobrenadante (5  $\mu l$ ) foi adicionado a 12 poços de uma microplaca e posteriormente adicionado à solução de reação (30 mM de imidazol, 45 mM de NaCl, 15 mM de KCl, 3 mM  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , KCN 0,4 mM, ATP 1,0 mM, 0,2 NADH mM, 0,1 mM, frutose-1,6 difosfato, 2 mM de PEP, 3 UI ml<sup>-1</sup> PK e 2 UI ml<sup>-1</sup> de



LDH). Quatro das doze cavidades receberam solução de reação com 2 mM de ouabaina, enquanto o homogenizado bruto de outras quatro cavidades receberam solução de reação com 2 mM de N-etilmaleimida. A taxa de oxidação do NADH foi monitorada em intervalos de 10s durante 10 min a 340 nm em temperatura ambiente. A diferença na inclinação da oxidação do NADH contra o tempo de reação entre solução de reação livre de inibidores e contendo inibidores (a ouabaina e a N-etilmaleimida) foi utilizada para determinar a atividades das enzimas  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-ATPase}$  e  $\text{H}^+ \text{-ATPase}$ , respectivamente. As atividades enzimáticas foram apresentadas em  $\mu\text{mol.h}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ .

#### 2.2.4 Medições do sistema de transporte de elétrons (ETS)

A ETS foi medida utilizando o método proposto por Packard (1971) e melhorado por Tóth (1993). As soluções foram preparadas 24 h antes da utilização e mantidas em gelo para evitar a decomposição do substrato e contaminação bacteriana. Todo o corpo do indivíduo foi macerado com nitrogênio líquido. O material homogeneizado previamente pesado (30-60 mg de massa húmida) foi, então, sonicado, utilizando um sonicador (VWR Scientific, modelo 450, EUA) em 4 mL de tampão de homogeneização arrefecido em gelo (fosfato de sódio 0,1 M bHF = 8,4; 75 pMMgSO<sub>4</sub>; % (P / v) de polivinilpirrolidona, 0,2% (v / v) de Triton-X-100) e centrifugado durante 4 min a 0 ° C a 8500 g utilizando uma centrífuga Eppendorf 5430R (Eppendorf, Alemanha). Três amostras de 0,5 mL de cada homogeneizado foram incubadas em 1,5 mL de solução de substrato (tampão de fosfato de sódio 0,1 M pH = 8,4, NADH 1,7 mM, NADPH 0,25 mM e Triton-X-100 0,2% (v / v) com 0,5 mL. 5mM2- (p-iodofenil) -3- (pnitrofenil) -5-feniltetrazólio (INT) durante 20 min à mesma temperatura de aclimação (27 ° CatDimona e Cat ° A 25 °). A reação foi parada por adição de 0,5 mL de 1: 1 Formalina: H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Foram incubados blocos (1,5 mL de solução de substratos e 0,5 mL de solução). Para as amostras foram adicionados 0,5 mL de homogeneizado depois de parar a ação. A produção de formazano foi determinada espectrofotometricamente a partir da absorbância da amostra a 490 nm contra o branco, no intervalo de 10 minutos após interrupção da reação, utilizando um espectrofotômetro Spectramax Plus 384 (Molecular Device, EUA). A atividade de ETS de cada animal foi determinada utilizando o procedimento descrito em Simčič e Brancelj (2003). A atividade de ETS foi medida como a taxa de redução do corante de tetrazólio para a formazana e convertida em oxigênio equivalente consumido por hora ( $\mu\text{LO}_2.\text{mgWW}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) como descrito por Kenner e Ahmed (1975).

### 2.2.5 Análise de Lactato no corpo

Os níveis de lactato (ácido láctico) plasmático são determinados segundo procedimento técnico da Sigma Chemical Co., no qual 100 µl de plasma é adicionado em 100 µl de ácido perclórico (PCA) e neutralização com KOH. O extrato neutralizado do plasma é adicionado a uma solução contendo, numa mistura, a enzima lactato desidrogenase (LDH, 10KU por ml), a coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD<sup>+</sup>), hidrazina e tampão glicina (0,6 mol L. pH 9.2). Neste método, a enzima converte o lactato, presente no extrato de plasma, a piruvato o qual é complexado a piruvatohidrazina, evitando a reconversão de piruvato para lactato. A reação ocorre com redução simultânea da coenzima NAD<sup>+</sup> e é monitorada através do decréscimo da absorbância em 340nm. decréscimo este proporcional à concentração original de lactato na amostra. Após 15 minutos, quando a reação processar-se completamente a 37 °C, os valores de lactato plasmático são obtidos através de uma curva de calibração previamente estabelecida e são expressas em mmoles de lactato/1 plasma. As leituras são feitas em um espectrofotômetro Spectronic Genesis 2.

### 2.2.6 Análise de Glicogênio no corpo

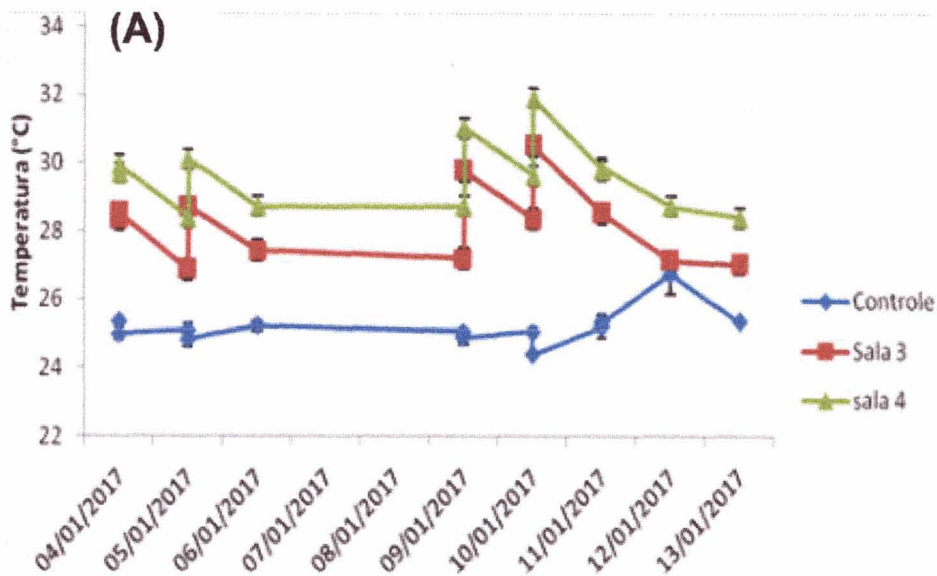
Para as análises de glicogênio (Bidinotto et al., 1997), amostras de músculo branco foram transferidas para tubo de ensaio (100 mg de tecido/mL de KOH 6,0N) e incubados por 3 minutos a 100 °C em banho-maria. Após a dissolução alcalina dos tecidos, 250 µL desses extratos eram transferidos para tubos de ensaio e adicionados de 3 mL de etanol e 100 µL de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% e submetidos à agitação. As amostras eram centrifugadas a 3.000 x g por 3 minuto. O sobrenadante de cada tubo de reação foi descartado por inversão e o precipitado ressuspendido em 2,5 mL de água destilada. Um volume adequado dessa diluição foi analisado quanto ao teor de açúcares totais pelo método hidrolítico ácido de Dubois et al. (1956) e o conteúdo de glicogênio, expresso em µmoles de glicosil-glicose/g de tecido.

### 2.3 Análise Estatística

Os dados foram analisados e apresentados como média ± erro padrão da média. A homogeneidade e homocedasticidade foram testadas *a priori* a fim de verificar a normalidade e homocedasticidade dos dados. Quando as premissas paramétricas foram violadas, testes correspondentes não paramétricos foram aplicados, e estão indicados. As variáveis taxa metabólica, fluxo de íons e Amônia, atividade enzimática foram analisadas por tratamento através de Anova one-way comparando entre as salas experimentais, seguido de post hoc de Tukey.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período experimental, como esperado, foram observadas diferenças na temperatura entre as salas, sendo que a sala controle apresentou temperatura média de  $25,3 \pm 0,14$ , a sala 3 (A1B), cenário moderado, apresentou temperatura média de  $28,3 \pm 1,19$ ; e a sala 4 (A2), cenário extremo teve temperaturas médias de  $29,6 \pm 0,08$ . Na figura 1a, podemos observar, ainda, que desde o início do experimento a temperatura já se mostrou mais elevada nos cenários climáticos propostos pelo (IPCC 2007). No entanto, ao contrário da temperatura, um aumento nos níveis de  $\text{CO}_2$  na água nas salas 3 e 4 só foi observados a partir do sétimo dia de experimento, como mostrado na figura 1b. Os níveis de  $\text{CO}_2$  em ppm no cenário controle se manteve em  $11 \pm 0,20$  ppm, sala 3, cenário moderado,  $15,75 \pm 0,20$  ppm e sala 4, cenário extremo,  $19 \pm 0,50$  ppm de  $\text{CO}_2$  na água e mostraram uma diferença a partir do sétimo dia de aclimação nas salas 3 e 4 que se manteve constante até o fim do experimento; isto se deve principalmente pela taxa de dissolução dos gases.



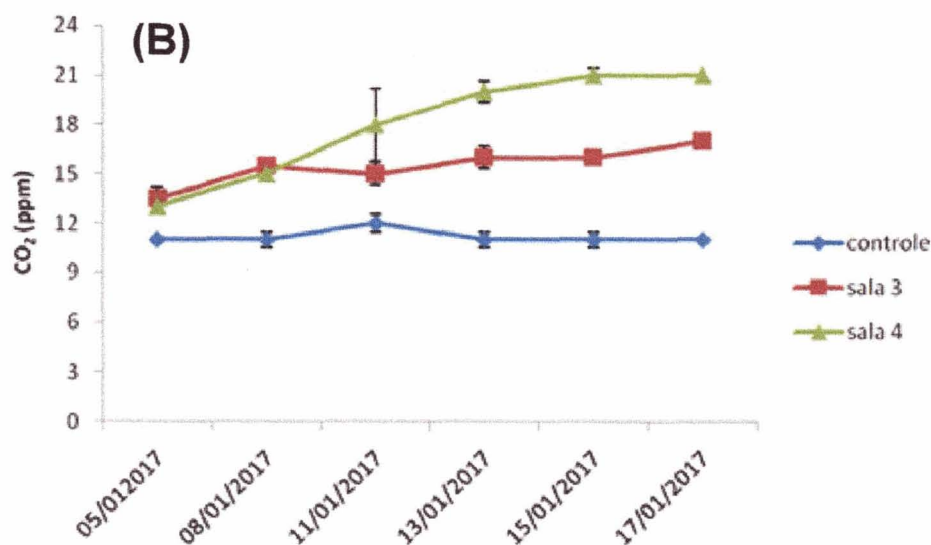


Figura 1. Variação temporal de (A) Temperatura e (B) CO<sub>2</sub> na água dos tanques de aclimação expostos aos diferentes cenários climáticos dentro das salas experimentais. Cenário controle (temperatura e CO<sub>2</sub> atuais), Cenário moderado (+400 ppm de CO<sub>2</sub> e aumento 2,5 °C; Sala 3), e extremo (+850 ppm de CO<sub>2</sub> e aumento de 4,5 °C, Sala 4).

Um dos mecanismos mais importantes que permitirão aos organismos enfrentar e se estabelecer frente às futuras mudanças ambientais é a capacidade de aclimação. No presente estudo nós observamos um aumento de 1.4 vezes na taxa metabólica (MO<sub>2</sub>) dos animais aclimatados ao cenário moderado A1B em relação ao cenário controle; os animais aclimatados no cenário A2 apresentaram um aumento de 1.8 vezes na taxa metabólica em relação ao cenário controle. Estas respostas mostram um típico efeito do aumento da temperatura sobre a demanda energética (Schulte 2015). Expondo juvenis de truta a altas temperaturas, Simčič *et al.* (2015) reportou um aumento na taxa de consumo de oxigênio causado pelas mudanças na cinética das reações bioquímicas e fisiológicas. Tais impactos no metabolismo podem ser extremamente prejudiciais, uma vez que a taxa metabólica de rotina representa um custo para manter suas necessidades fisiológicas normais. Este aumento dos custos basais observados aqui deve estar relacionado à síntese proteica e manutenção do equilíbrio ácido-base, como discutiremos posteriormente.

Não foi observado aumento da atividade da ETS (Sistema de transporte de elétrons), indicando que *P. brevis* têm pouca habilidade de aumentar o seu potencial metabólico, portanto, já

opera perto do seu máximo metabólico, visto que a atividade da ETS é uma medida bioquímica do potencial metabólico, e representa o valor do consumo de oxigênio esperado se todas as enzimas da cadeia respiratória funcionassem na atividade máxima. De fato, nossos resultados corroboram com a literatura, com outros trabalhos mostrando espécies tropicais com baixa capacidade de aumento da respiração mitocondrial frente ao aumento de temperatura (Iftikar *et al.* 2014).

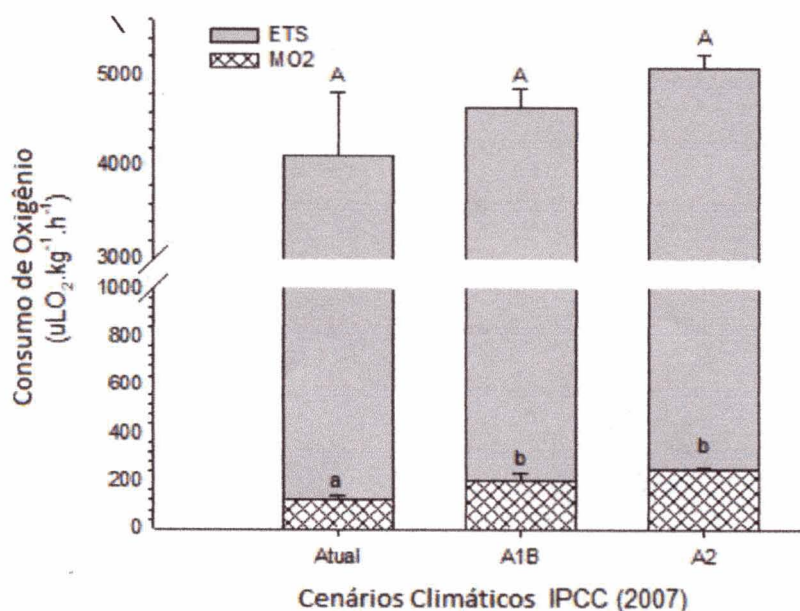


Figura 2. Consumo de oxigênio (MO<sub>2</sub>) e Sistemas de transporte de elétrons (ETS) em *Pyrrhulina aff brevis* expostas aos cenários climáticos proposto pelo IPCC (2007) para o ano de 2100; Atual (25°C e 300 ppm CO<sub>2</sub>), A1B (+2.5°C e +400 ppm CO<sub>2</sub>) e A2 (+4.5°C e +850 ppm CO<sub>2</sub>). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os cenários climáticos por ANOVA uma via seguido de post-hoc de Tukey (p<0,05).

Nossos resultados mostram que nos cenários climáticos A1B e A2 houve uma redução na relação entre capacidade do sistema de transporte de elétrons (ETS) e taxa metabólica (MO<sub>2</sub>). A relação ETS e MO<sub>2</sub> é um indicativo de que o escopo aeróbico, ou seja, a reserva energética disponível para as realizações das atividades biológicas, foi reduzido nos cenários climáticos mais desafiadores A1B e A2. Hipotetiza-se que o escopo aeróbico está fortemente ligado à janela térmica e provavelmente será maximizado na temperatura ideal das espécies, teoria conhecida como tolerância térmica limitada em oxigênio e capacidade (OCLTT) (Pörtner e Knust 2007; Pörtner e Peck 2010;

Pörtner 2010). A tolerância térmica limitada pela capacidade de oxigênio prevê um declínio do escopo em ambos os lados da janela térmica, como resultado da diminuição da capacidade dos sistemas ventilatórios e circulatórios para cobrir os custos fisiológicos acima dos níveis de manutenção, levando a hipoxemia (hipóxia tissular) (Pörtner e Farrell 2008; Pörtner 2010). Em altas temperaturas, o fornecimento de oxigênio pode se tornar limitado por restrições ventilatórias e circulatórias, com base neste conceito, o alcance para o desempenho aeróbio deve diminuir acima da faixa de temperatura ideal. Portanto, assim como a tolerância térmica, o desempenho máximo das espécies está ligado à capacidade aeróbica do animal, uma vez que o aquecimento perturba o equilíbrio da oferta e demanda de oxigênio (Pörtner 2002). Especificamente, a diminuição do escopo aeróbico prevê limitação no crescimento, na reprodução e nas atividades em temperaturas altas e baixas, o que por sua vez limita a distribuição geografia de uma espécie (Fry 1947; Brett 1971; Wang e Overgaard 2007; Farrell 2009). De fato, nós observamos uma diminuição no potencial metabólico em *Pyrrhulina aff brevis* aclimatados aos cenários climáticos A1B e A2. O conceito OCLTT tem sido bem sucedido na explicação da relação entre o aumento da temperatura da água e as mudanças na distribuição e abundância de eel pout (*Zoarces viviparous*) (Pörtner e Knust 2007), na previsão da migração em salmão-salmão (*Oncorhynchus nerka*) (Farrell *et al.* 2008; Eliason *et al.* 2011) e na explicação da variação de contra-gradiente no AS em alguns peixes de coral (Nilsson *et al.* 2009). Portanto, aclimatados a altas temperaturas, esta espécie *Pyrrhulina aff brevis* diminui a sua capacidade aeróbica, com possíveis consequências para a sua locomoção, crescimento e reprodução (Figura 3).

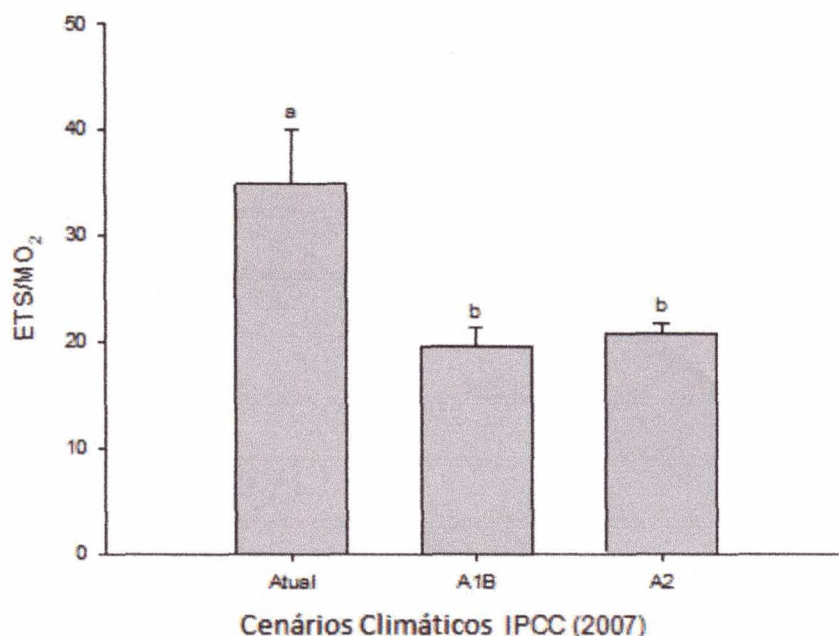


Figura 3. Relação entre Sistema de transporte de elétrons (ETS) e Consumo de oxigênio (MO<sub>2</sub>) em *Pyrrhulina aff brevis* em cenários climáticos propostos pelo IPCC (2007) para o ano de 2100; Atual (25°C e 300 ppm CO<sub>2</sub>), A1B (+2.5°C e +400 ppm CO<sub>2</sub>) e A2 (+4.5°C e +850 ppm CO<sub>2</sub>). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os cenários climáticos por ANOVA uma via seguido de post-hoc de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

À medida que a temperatura ambiental aumenta, a demanda de oxigênio também aumenta e os organismos devem suprir o consumo de oxigênio para compensar esse aumento da demanda. Se a demanda não for atendida, os tecidos se tornam hipóxicos (Pörtner *et al.* 2005), sendo necessária a compensação metabólica através do metabolismo anaeróbico. O metabolismo anaeróbico é documentado como uma ferramenta comum para combater o estresse fisiológico que acompanha o aumento do nível ambiental de temperatura (Pörtner *et al.* 2005). Além de um aumento nas taxas metabólicas, que indica uma necessidade maior do metabolismo aeróbico, *Pyrrhulina aff brevis* também apresentou um aumento nas concentrações de lactato no corpo. Estes dados sugerem uma necessidade da utilização do metabolismo anaeróbico com o propósito de suprir o aumento das demandas energéticas (Almeida-Val *et al.* 2000). Embora à primeira vista a utilização do metabolismo anaeróbico pareça ser benéfico, o acúmulo do lactato no músculo implica na perda de capacidade de contração muscular e acidose celular.

Além disso, durante o período de exposição de 15 dias, nós observamos que nos cenários A1B e A2, os peixes apresentavam mobilidade reduzida quando comparados com os indivíduos da sala controle, embora nenhuma medição tenha sido efetuada e registrada, este é um forte indicativo de que uma limitação das necessidades energéticas pode estar comprometendo a locomoção nos cenários climáticos mais extremos. Portanto, podemos esperar que os aumentos de temperatura e CO<sub>2</sub> causem uma perda de mobilidade que será extremamente danosa uma vez que essa espécie depende de saltos para se locomover entre as poças onde vivem e utilizam para reprodução (Espírito-Santo e Zuanon 2016). Baseados nestes resultados podemos esperar uma diminuição na distribuição desta espécie, assim como apontado no estudo de Pörtner e Knust (2007) para *Zoarces viviparous*.

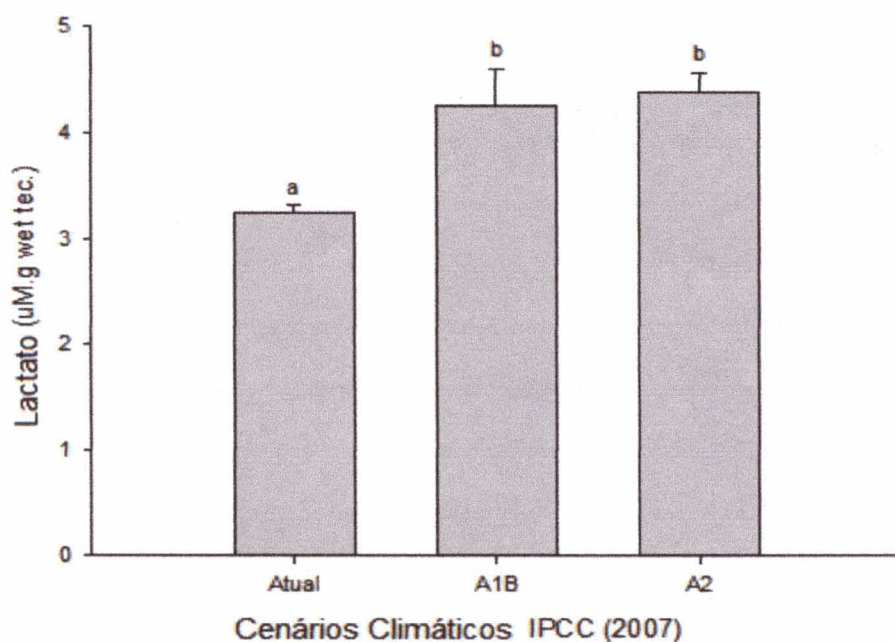


Figura 4. Níveis de lactato em indivíduos de *Pyrrhulina aff brevis* expostos aos cenários climáticos propostos pelo IPCC (2007) para o ano de 2100; Atual (25°C e 300 ppm CO<sub>2</sub>), A1B (+2.5°C e +400 ppm CO<sub>2</sub>) e A2 (+4.5°C e +850 ppm CO<sub>2</sub>). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os cenários climáticos por ANOVA uma via seguido de post-hoc de Tukey (p<0,05).



Os exemplares de *Pyrrhulina aff brevis* apresentaram respostas similares na concentração de Glicogênio entre os cenários climáticos (Atual, A1B e A2) após 15 dias de aclimação. Tais fatores demonstram que a espécie aclimatada nos cenários A1B e A2 não utiliza os carboidratos como fonte de energia primária, utilizando outras fontes de energia para manter seus níveis de glicogênio inalterados em diferentes cenários climáticos (Figura 5).

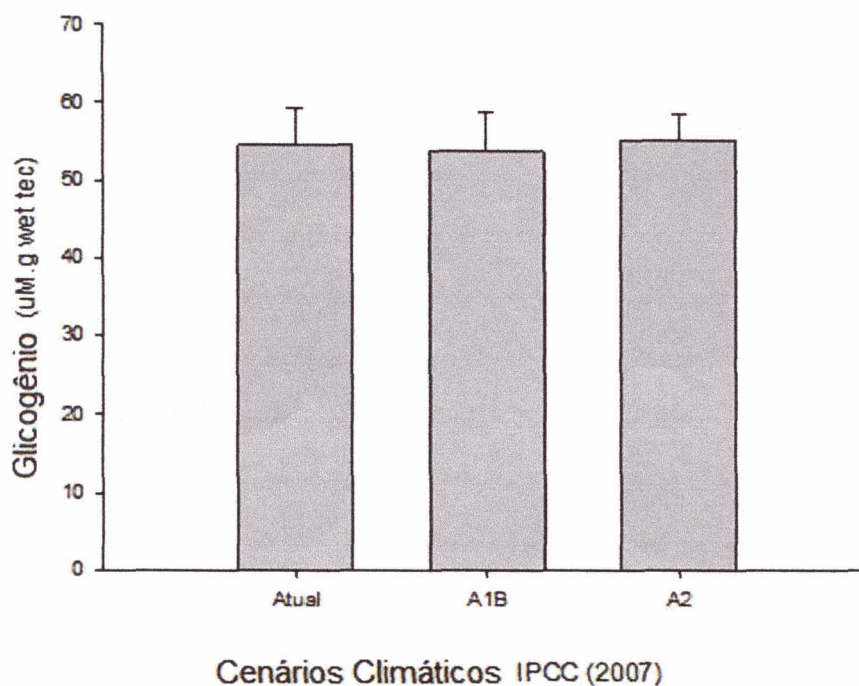


Figura 5. Níveis de glicogênio em *Pyrrhulina aff brevis* expostas aos cenários climáticos propostos pelo IPCC (2007) para o ano de 2100; Atual (25°C e 300 ppm CO<sub>2</sub>), A1B (+2.5°C e +400 ppm CO<sub>2</sub>) e A2 (+4.5°C e +850 ppm CO<sub>2</sub>). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os cenários climáticos por ANOVA uma via seguido de post-hoc de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Tabela 1. Níveis de Amônia (NH<sub>3</sub>), sódio (Na<sup>+</sup>), potássio (K<sup>+</sup>), na água (umol.mg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) e atividade das enzimas enzima Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase e H<sup>+</sup>-ATPase (umolATP.H<sup>-1</sup>.mg prot) em *Pyrrhulina aff brevis* expostas aos cenários climáticos proposto pelo IPCC (2007) para o ano de 2100; Atual (25°C e 300ppm CO<sub>2</sub>), A1B (+2.5°C e +400 ppm CO<sub>2</sub>) e A2 (+4.5°C e +850 ppm CO<sub>2</sub>). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os cenários climáticos por ANOVA uma via seguido de post-hoc de Tukey (p≤0,05).

	Atual	A1B	A2
Amônia	658,88 ±68,1 <sup>a</sup>	1117,48 ± 171,73 <sup>b</sup>	1400±60,19 <sup>b</sup>
Na <sup>+</sup> da água	131,78±69,20	76,29 ±15,93	26,52±58,00
K <sup>+</sup> da água	317,49±49,0	367,54± 54,24	456,98±110,45
Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> -ATPase	3,99±2,53	4,01±1,17	3,57±0,9
H <sup>+</sup> -ATPase	4,82±0,63 <sup>a</sup>	9,43±1,26 <sup>b</sup>	8,23±0,44 <sup>b</sup>

As análises de efluxo (perda de íons) mostram que nos cenários A1B e A2 ocorreu uma grande excreção de amônia em relação ao cenário controle. A amônia é resultado dos processos de oxidação de proteínas ou aminoácidos. Tal resultado nos leva a sugerir que um aumento no consumo de oxigênio, concomitantemente com o aumento na excreção de amônia, foi devido ao aumento na oxidação de proteínas a fim de suprir a demanda energética, visto que nenhuma alteração foi observada nas reservas de glicogênio. Para tanto, o aumento na taxa metabólica pode ser uma consequência da síntese de novas proteínas.

A exposição aos cenários climáticos não foi suficiente para alterar significativamente a atividade da enzima Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase nas brânquias de *Pyrrhulina aff brevis*, no entanto pudemos observar um aumento na concentração de K<sup>+</sup> na água indicando que houve uma compensação na flexibilidade das brânquias, que facilitou a perda de íons. Segundo McBryan *et al.* (2016), quando aclimatados a altas temperaturas, indivíduos da espécie *Fundulus heteroclitus* apresentam aumento da área de superfície lamelar facilitando, assim, a tomada de oxigênio. Deste modo, o aumento do efluxo de K<sup>+</sup> pode estar ligado diretamente ao aumento na flexibilidade das membranas causado pela necessidade de favorecer a tomada de oxigênio, uma típica resposta do compromisso osmorespiratório. Embora nenhuma alteração tenha sido observada na atividade da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase, notou-se um aumento na H<sup>+</sup>-ATPase, indicando que o aumento do CO<sub>2</sub> alterou o pH interno, e para bombear mais hidrogênio do meio interno para o meio externo, houve um aumento dessa atividade; ou, ainda, um indicativo de que o lactato alterou o pH interno, causando um desbalanço osmótico.

## 4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que, mesmo em cenários climáticos mais moderados, *Pyrrhulina aff brevis* estará sujeita a grandes alterações fisiológicas. O aumento da taxa metabólica basal e das concentrações de Lactato mostram um aumento nas demandas energéticas desta espécie que poderá implicar em desafios para a sobrevivência, crescimento, distribuição e reprodução. Além disso, alterações na concentração de Amônia e  $K^+$ , bem como o aumento na atividade da enzima  $H^+$ -ATPase indicam um desbalanço osmótico que pode ser responsável pelo aumento da demanda metabólica nesta espécie.

Portanto, concluímos que *Pyrrhulina aff brevis* apresenta um desbalanço no compromisso respiratório com implicações na sua fisiologia e que esta espécie tem potencial para ser utilizada como bioindicadora das alterações climáticas na região Amazônica.

## 5. REFERÊNCIAS

- Almeida-Val, V.M.F.; Val, A.L.; Ducan, W.P.; Souza, F.C.A.; Paula-Silva, M.N.; Land, S. 2000. Scalling effects on hypoxia tolerance in the Amazon fish *Astronotus ocellatus* (Perciformes: Cichlidae): contribution of tissue enzyme levels. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, V.125, p.219-226.
- Bidinotto, P.M.; Souza, R.H.S.; Moraes, G. 1997. Hepatic glycogen in eight tropical freshwater teleost fish: Procedure for field determinations of microsamples. *Boletim Técnico do CEPTA-Pirassununga*, v.10, p.53-60.
- Brauner, C.J.; Matey, V.; Zhang, W.; Ricards, J.G.; Dhillon R, Cao ZD, Fu S-J. 2011. Gill remodeling in crucian carp during sustained exercise and the effect on subsequent swimming performance. *Physiological and Biochememichal Zoology*, 84:535-542.
- Brett, J.R.1971. Energetic responses of salmon to temperature. A study of some thermal relations in the physiology and freshwater ecology of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Am. Zool.* 11, 99-113.
- Brusca, R.; Brusca, G.J. 2007. *Invertebrados*. 2a ed. Guanabara Koogan. 968 pp.
- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.T.; Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v.28, p.350-358.
- Eliason, E.J.; Clark, T.D.; Hague, M.J.; Hanson, L.M.; Gallagher, Z.S.; Jeffries, K.M.; Gale, M.K.; Patterson, D.A.; Hinch, S.G.; Farre, A.P. 2011. Differences in Thermal Tolerance Among Sockeye Salmon Populations, *Science*. V. 332, Issue 6025, 109-112.
- Espirito-Santo, H.M.V.; Zuanon, J. 2016. Temporary pools provide stability to fish assemblages in Amazon headwater streams. *Ecology*. 9 p.
- Evans, D.H.; Piermarini, P.M.; Choe, K.P. 2005. The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. *American Physiological Society*, V. 85, 97-177.
- Fabry, V.J.; Seibel, B.A.; Feely, R.A.; Orr, J.C. 2008. Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. *ICES J Mar Sci*, 65:414-432.
- Farrell, A.P.; Hinch, S.G.; Cooke, S.J.; Patterson, D.A.; Crossin, G.T.; Lapointe, M.; Mathes, M.T. 2008. Pacific Salmon in Hot Water: Applying Aerobic Scope Models and Biotelemetry to Predict the Success of Spawning Migrations. *Physiological and Biochemical Zoology*, 81(6):697-708.

Farrell, A.P. 2009. Environment, antecedents and climate change: lessons from the study of temperature physiology and river migration of salmonids. *Journal of Experimental Biology*, 212: 3771-3780.

Fry, F.E.J. 1947. Effect of the environment on animal activity. *Univ. Toronto Stud. Biol. Ser.* 55:1-62.

Gonzales, R.J.; McDonald D.G. 1992. The relationship between oxygen consumption and ion loss in a freshwater fish. *Journal of Experimental Biology*, 204: 2861-2872.

Haney, D.; Nordlie, F. 1997. Influence of environmental salinity on routine metabolic rate and critical tension of *Cyprinodon variegatus*. *Physiological Zoology*, 70: 511-518.

Hochachka, P.W.; Somero G.N. 2002. *Biochemical Adaptation – Mechanisms and Process in Physiological Evolution*. Oxford University Press, New York, 466p.

Iftikar, F.I.; MacDonald, J.R.; Baker, D.W.; Renshaw, G.M.C.; Hickey, A. J. R. 2014. Could thermal sensitivity of mitochondria determine species distribution in a changing climate? *Journal of Experimental Biology*, 217: 2348-2357.

IPCC- Intergovernmental Panel on Climate Change – IPCC. *Climate Change*. 2007. The physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.

IPCC- Intergovernmental Panel on Climate change. 2013. The physical science basis. In: Stocker, T.F.; Qin, D.; Plattner, G.K.; Tignor, M.; Allen, S.K.; Boschung, J.; Nauels, A.; Xia, Y.; Bex, V.; Midgley, P.M. (eds.) *Contribution of working group I to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, p 1535.

Kenner, R.A.; Ahmed, S.I. 1975. Measurements of electron transport activities in marine phytoplankton. *Mar. Biol.* 33, 119-127.

Kültz, D.; Somero, G.N. 1995. Osmotic and thermal effects on in situ ATPase activity in permeabilized gill epithelial cells of the fish *Gillichthys mirabilis*. *The Journal of Experimental Biology* 198, 1883-1894.

McBryan, T.L.; Healy, T.M.; Haakons. K. L.; Schulte, P. M. 2016. Warm acclimation improves hypoxia tolerance in *Fundulus heteroclitus*. *Journal of Experimental Biology*. 219: 474-484.

Mendonça, F.P.; Magnusson, W.E.; Zuanon, J. 2005. Relationships between habitats characteristics and fish assemblages in small streams of Central Amazonia. *Copeia*, 4: 751-764.

Nilsson, R.; Schultz, I.J.; Pierce, E.L.; Soltis, K.A.; Naranuntarat, A.; Ward, D.M.; Baughman, J.M.; Paradkar, P.N.; Kingsley, P.D.; Culotta, V.C.; Kaplan, J.; Palis, J.; Paw, B.H.; Mootha, V.K. 2009. Discovery of genes essential for heme biosynthesis through large-scale gene expression analysis. *Cell Metabolism*, 10(2): 119-130.

Packard, T.T. 1971. The measurement of respiratory electron-transport activity in marine phytoplankton. *J. Mar. Res.* 29, 235–244.

Perry, S.F.; Gilmour, K.M. 2002. Sensing and transfer of respiratory gases at the fish gill. *J. Exp. Zool.*, 293(3):249-63.

Perry, S.F.; Gilmour, K.M. 2006. Acid-base balance and CO<sub>2</sub> excretion in fish: unanswered questions and emerging models. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 154(1-2):199-215.

Pörtner, H.O. 2002. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comp Biochem Physiology*, 132:739–761.

Pörtner, H.O.; Langenbuch, M.; Michaelidis, B. 2005. Synergistic effects of temperature extremes, hypoxia, and increases in CO<sub>2</sub> on marine animals: From Earth history to global change. *Journal of Geophysical Research*, V. 110, 09-10.

Pörtner, H.O.; Knust, R. 2007. Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science*, 315:95–97.

Pörtner, H.O.; Farrel, A.P. 2008. Physiology and Climate Change. *Science*, V. 322, Issue 5902, pp. 690-692.

Pörtner, H.O. 2010. Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. *Journal of Experimental Biology*, 15;213(6):881-93.

Pörtner, H.O.; Peck, M.A. 2010. Climate change effects on fishes and fisheries: towards a cause-and-effect understanding. *Journal of Experimental Biology*, 77(8):1745-79.

Pörtner, H. O.; Karl, D.M.; Boyd, P.W.; Cheung, W.W.L.; Lluch-Cota, S.E.; Nojiri, Y.; Schmidt, D.N.; Zavialov, P.O. 2014. Ocean systems. In: Field, C.B.; Barros, V.R.; Dokken, D.J.; Mach, K.J.; Mastrandrea, M.D.; Bilir, T.E.; Chatterjee, M.; Ebi, K.L.; Estrada, Y.O.; Genova, R.C.; Girma, B.; Kissel, E.S.; Levy, A.N.; MacCracken, S.; Mastrandrea, P.R.; White, L.L. Climate change 2014: impacts, adaptation, and vulnerability part A: global and sectoral aspects contribution of working Group II to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, pp 411–484.

Prang, G. 2008. An industry analysis of the freshwater ornamental fishery with particular reference to the supply of Brazilian freshwater ornamentals to the UK market. *Uakari*, 3: 7-51.

Randall, D.J.; Baumgarten, D.; Malyusz, M. 1972. The relationship between gas and ion transfer across the gills of fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 41:629-637.

Robertson, L.M.; Kochhann, D.; Bianchini, A.; Matey, V.; Almeida-Val, V.M. F.; Val, A. L.; Wood C.M. 2015. Gill paracellular permeability and the osmorepiratory compromise during exercise in the hypoxia-tolerant Amazonian oscar (*Astronotus ocellatus*). *Journal Comparative Physiology Biochemistry*, 185,741.

Sardela, B.; Matey, V.; Cooper, J.; Gonzalez, R.J.; Brauner, C.J. 2004. Physiological, biochemical, and morphological indicators of osmoregulatory stress in California Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus* x *O. urolepis hornorum*) exposed to hypersaline water. *Journal of Experimental Biology*, 207: 1399-1413.

Schulte, P.M. 2015. The effects of temperature on aerobic metabolism: towards a mechanistic understanding of the responses of ectotherms to a changing environment. *Journal of Experimental Biology*. V. 218, 1856-1866.

Silva, N.C.S.; Costa, A.J.L.; Louvise, J.; Soares, B.E.; Reis, V.C.S.; Albrecht, M.P.; Caramaschi, E. P. 2016. Resource partitioning and ecomorphological variation in two syntopic species of Lebiasinidae (Characiformes) in an Amazonian stream. *Acta Amazonica*. V. 46(1) 25 – 36.

Simčič, T.; Brancelj, A. 2003 Estimation of the proportion of metabolically active mass in the amphipod *Gammarus fossarum*. *Freshwater Biol.*, 48, 1093–1099.

Simčič, T.; Jesensek, D.; Brancelj, A. 2015. Effects of increased temperature on metabolic activity and oxidative stress in the first life stages of marble trout (*Salmo marmoratus*). *Fish Physiology and Biochemistry*. V 41 1005–1014.

Tóth, G. L. 1993. Electron transport system (ETS) activity of the plankton, sediment and biofilm in Lake Balaton (Hungary). *Verh. Int. Ver. Limnol.* 25, 680–68.

Verdouw, H.; Eched, V.C.J.A.; Dekkers, E.M.J. 1978. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. *Wat. Resea.*, 12: 397-402.

Wang, T.; Overgaard, J. 2007. The Heartbreak of Adapting to Global Warming, *Science*, V, 315, Issue 5808, pp. 49-50.