

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CAMPUS DE BOTUCATU



## **AVALIAÇÃO DO BEM-ESTAR DA TILÁPIA-DO-NILO A PARTIR DO ESFORÇO PARA OBTENÇÃO DE CONDIÇÕES DE PREFERÊNCIA**

**Renato Hajenius Aché de Freitas**



Orientador: Gilson Luiz Volpato

Botucatu  
2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DO BEM-ESTAR DA TILÁPIA-DO-  
NILO A PARTIR DO ESFORÇO PARA OBTENÇÃO  
DE CONDIÇÕES DE PREFERÊNCIA**

**Renato Hajenius Aché de Freitas**

Orientador: Gilson Luiz Volpato

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Bociências da UNESP – Campus Botucatu – SP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor.

Botucatu  
2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Freitas, Renato Hajenius Aché de.

Avaliação do bem-estar da tilápia-do-Nilo a partir do esforço para obtenção de condições de preferência / Renato Hajenius Aché de Freitas. - Botucatu, 2011

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, 2011

Orientador: Gilson Luiz Volpato

Capes: 20404000

1. Tilápia (Peixe) - Comportamento. 2. Animais – Proteção.

Palavras-chave: Bem-estar; Comportamento; Cor ambiental; Esforço; Intensidade luminosa; Motivação; *Oreochromis niloticus*; Preferência; Sedimento; Teste de escolha.

*“Real respect for animals will come when we see them as sentient beings in their own right, with their own views and opinions, their own likes and dislikes. The animal voice should be heard.”*

Marian Stamp Dawkins

(2006, Appl Anim Behav Sci 100:4–10)

## **AGRADECIMENTOS:**

➤ Ao meu Grande Amigo e Orientador, Gilson, pela confiança depositada desde o início, orientação neste e em outros trabalhos, conselhos e ensinamentos profissionais e de vida, enfim, um Grande Mestre, obrigado por tudo;

➤ À minha maravilhosa esposa Karina, que sem ela isso não seria possível. Obrigado por me agüentar e principalmente por me dar o suporte e ajuda necessária para tornar isso real. Obrigado também por viver este trabalho e me ajudar como autora em grande parte. Te amo de mais!!! Você além de esposa mostrou-se uma ótima mãe nestes últimos dois anos.

➤ À minha mais Nova Motivação de Viver, Pamela!!! Você ainda não faz idéia o quanto me ajudou, mas um dia entenderá e talvez logo, pois aprende muito rápido as coisas. Te amo minha Pequena!!!

➤ Aos meus Pais, grandes incentivadores. Vocês são mais que especiais, são mais do que qualquer filho pode sonhar. Vocês sempre estão ao meu lado, me apoiando em tudo, dando não só o suporte, mas toda a fundação e acabamento necessário. Espero um dia poder ser tão especial para a minha filha, quanto vocês são para mim. Amo muito vocês.

➤ Ao meu Irmãozão, Fê e sua Pequena Escudeira, Má. Vocês são demais, mesmo de longe levantam o astral de qualquer um. Obrigado queridos. Embora poucas às vezes que nos vemos, a energia que vocês transmitem me revigora para seguir em frente;

➤ À minha Família de Avaré: Adel, Angela, Carol, Alan, Tati, César, Carmem e Isa, que dia a dia me apóiam e ajudam nessa empreitada do viver. Obrigado por tudo, pois sempre que precisei mais próximo de alguma coisa, era com vocês que contava. Valeu mesmo.

➤ Ao meu sempre companheiro Blaze, que dispensa qualquer comentário.

➤ Ao Prof. Dr. Adalberto Luis Val, Prof. Dr. Rodrigo Egydio Barreto, Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati, Prof. Dr. Leonardo José Gil Barcellos, Profa. Dra. Percilia Cardoso Giaquinto, Profa. Dra. Eliane Gonçalves-de-Freitas, Profa. Dra. Marisa Fernandes de Castilho, Prof. Dr. Helton Carlos Delício que aceitaram contribuir com este trabalho e com a minha formação em um importantíssimo passo da minha carreira. Meus sinceros agradecimentos;

➤ Ao Prof. Dr. Hoshino por inúmeras lições de vida, discussões de idéias, incentivos, confiança, ajuda no curso de Fisiologia Comparada que ministrei e da parceria no desenvolvimento dos projetos com os alunos em Fisiologia. Foi incrível!!! Obrigado.

➤ Ao Prof. Dr. Carlão e Profa. Dra. Inês Fonseca pela grande ajuda, discussão de teorias e ensinamentos na parte estatística;

- À Sra. Coordenadora Profa. Dra. Maria Lúcia Negreiros Fransozo pela sempre disposição em ajudar e por lutar por essa Pós;
- Aos Professores Dr. Adílson Fransozo e Dr. Fábio Porto-Foresti pelo companheirismo, dedicação e ajuda não só Comissão de Bolsas, mas também pela amizade;
- Aos incansáveis companheiros da Seção de Pós Graduação, Sérgio, Heri, Lú, Davi e Madalena pelas diversas ajudas;
- Aos funcionários do Departamento de Fisiologia, em especial à Luciana, Tardivo, Hélio e Juninho que não medem esforços em poder ajudar. Mais uma vez, meu muito obrigado;
- Aos amigos do Laboratório, Grazi, Fer, Carolzinha, Carol, Danielle, Daniela, Dyeno, Helen, Lara, Lígia, Viviane, Vivian, Zé, Nana, Thaís, Nilo, Balboa, Rodrigo, Mônica, Karollen, pelo apoio, ensinamentos, ombro amigo, discussão de idéias, ajuda nos manuscritos e partes laboratoriais e etc.
- Aos Amigos de República Biotererê pela irmandade de sempre;
- Aos Amigos da Pós, em especial ao Guilherme, Babalu, Domingos, Márcio, Pedro, Konrado e Igor pela amizade e ajuda diversa;
- Aos Professores, Pesquisadores e Funcionários da UNESP de Bauru e São Vicente que me receberam de portas abertas e contribuíram de uma forma ou de outra, não só neste trabalho, mas também na minha formação;
- A todos os meus alunos que me incentivam ainda mais para continuar lecionando e pesquisando. Vocês são o meu maior “*feedback*”!!! Obrigado;
- A todos aqueles que dedicam esforços para contribuir com o bem-estar animal, seja cientificamente ou da maneira mais pura e instintiva dos atos;

#### SUPORTE:



Laboratório de Fisiologia e  
Comportamento Animal



## SUMÁRIO:

RESUMO GERAL.....	viii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
OBJETIVOS .....	3
GERAL .....	3
ESPECÍFICOS .....	3
MATERIAL E MÉTODOS GERAL.....	4
ANIMAIS E MANUTENÇÃO.....	4
ESQUEMA GERAL DA TESE.....	4
Estudo 1: Análise de preferências (Capítulos 1 a 3) .....	5
Estudo 2: Esforço × Preferência (Capítulo 4) .....	5
Estudo 3: Efeito aditivo de recursos no esforço investido e comparativo com alimento (Capítulo 5) .....	6
ÉTICA.....	6
CAPÍTULO 1:.....	7
1. Introdução .....	8
2. Material e Métodos .....	9
2.1. Delineamento .....	9
2.2. Procedimentos específicos .....	10
2.3. Registro e análise de dados .....	10
3. Resultados .....	11
4. Discussão .....	14
CAPÍTULO 2:.....	18
1. Introdução .....	19
2. Material e Métodos .....	20
2.1. Delineamento .....	20
2.2. Procedimentos específicos .....	21
2.3. Registro e análise de dados .....	22
3. Resultados .....	23
4. Discussão .....	25
CAPÍTULO 3:.....	28
1. Introdução .....	29
2. Material e Métodos .....	30

2.1. Delineamento .....	30
2.2. Procedimentos específicos .....	31
2.3. Registro e análise de dados .....	33
3. Resultados .....	33
4. Discussão .....	38
CAPÍTULO 4:.....	42
1. Introdução .....	43
2. Material e Métodos .....	44
2.1. Experimento 1 .....	44
2.1.1. Delineamento .....	44
2.1.2. Procedimentos.....	47
2.1.3. Análise estatística.....	48
2.2. Experimento 2.....	49
2.2.1. Delineamento .....	49
2.2.2. Procedimentos.....	50
2.2.3. Análise estatística.....	50
3. Resultados .....	50
3.1. Experimento 1 .....	50
3.2. Experimento 2.....	57
4. Discussão .....	58
CAPÍTULO 5:.....	62
1. Introdução .....	63
2. Material e Métodos .....	64
2.1. Delineamento .....	64
2.2. Procedimentos.....	65
2.3. Análise estatística.....	67
3. Resultados .....	67
3.1. Hipóteses (i - aumento do esforço com aumento do número de recursos) e (ii - esforço para obter alimento é maior do que para obter recurso(s) não alimentar(es)) .....	67
3.2. Hipótese (iii - aumento de jejum aumenta a motivação para obter alimento) .....	73
4. Discussão .....	75
CONCLUSÕES GERAIS .....	78
REFERÊNCIAS.....	79

## **RESUMO GERAL**

Inicialmente investigamos condições de preferência dos peixes em relação à granulometria de sedimento de rio, coloração ambiental e intensidade de luz na cor ambiental preferida. Posteriormente, avaliamos a tese central de que o esforço que o peixe realiza para atingir determinado objetivo é um indicador da relevância do mesmo (condição a ser atingida) para melhorar seu bem-estar. Assim, determinamos uma forma de se impingir esforço ao animal para que obtenha a condição de sua preferência. Avaliamos a preferência por meio da frequência de visita em compartimentos contendo diferentes condições da variável testada. Concluímos que a preferência pela granulometria do sedimento para visitar está relacionada com a amplitude bucal do indivíduo. Além disso, a preferência pode ser dependente da motivação para se reproduzir ou alimentar-se. A tilápia mostrou preferência pela cor ambiental amarela e, nessa cor, prefere intensidades abaixo de 200 lux de maneira consistente e independente do período. Abaixo disso só apresenta preferência no período da manhã, sendo essa de ~ 80 lux. Sugerimos que a tomada de decisão por todas essas variáveis seja mais expressiva pela manhã. Posteriormente, mensuramos o esforço a partir da intensidade de toque na porta de acesso a um recurso preferencial quando essa era bloqueada e da latência do primeiro toque nessa porta. Os peixes realizam esforço diferenciado para conseguir determinado recurso, sugerindo que quanto maior o esforço mais relevante é o recurso para seu bem-estar. A tilápia escolhe toca ao invés de sedimento ou cor ambiental amarela quando são apresentados concomitantemente, mas tem maior motivação (realizam maior esforço) para alcançar o sedimento. Portanto, também fica claro que o emprego dessas duas metodologias (escolha e esforço) deve ser levado em consideração para avaliar o enriquecimento ambiental oferecido, o que pode melhorar ainda mais as condições de bem-estar. O sedimento parece ser o recurso mais importante em relação à toca e cor ambiental amarela. A motivação para obter somente o sedimento ou em associação com os outros recursos foi igual à obtenção de alimento, sugerindo que sedimento seja tão importante quanto alimentar-se. O estado interno da tilápia parece ser diferente entre o jejum de 48 h e 24 h, pois o esforço que a tilápia “paga” para obter alimento em jejum de 48 h é maior que em 24 h, porém a latência para obter o alimento é igual. Oferecer recursos para os peixes pode melhorar as condições de bem-estar, uma vez que têm motivação para obtê-los, mas sugerimos que sejam utilizados com parcimônia, pois quantidade não significa qualidade e outros parâmetros podem ser comprometidos ao se oferecer um recurso.

## INTRODUÇÃO GERAL

Dentre os vários problemas enfrentados na produção de peixes, mais recentemente têm adentrado na piscicultura as preocupações sobre o bem-estar desses animais. O bem-estar animal é uma preocupação antiga, já existente desde a Renascença (Jennings, 1998), mas que perdeu força com o advento do Behaviorismo desde o início do século passado, onde se concebia o animal como um ser autômato, destituído de emoções (Dawkins, 2006). O interesse pelo bem-estar animal foi reativado após a publicação do livro “Animal Machine” de Ruth Harrison, em 1964. Atualmente, diversos trabalhos têm sugerido emoção em animais não humanos (*e.g.* Jennings, 1998; Lehman, 1998), o que traz à tona a discussão sobre o quanto esses animais são capazes de terem consciência tanto do seu próprio sofrimento como do seu conforto (capacidade chamada de *senciência*), ou seja, envolve bem-estar.

As preocupações com o bem-estar têm sido direcionadas geralmente para espécies com alto nível de cognição e habilidade associada para experimentar dor e sofrimento (Conte, 2004). Assim, no caso dos peixes, a polêmica ficou despercebida devido à dificuldade em se mostrar que esses animais sentem dor. Nesse aspecto, alguns trabalhos procuraram mostrar argumentos lógicos de que esses seres podiam sofrer (*e.g.* Balon, 2000; Volpato, 2000). No entanto, o trabalho de Rose (2002) se propôs a mostrar de forma conclusiva que não há substratos neurofisiológicos que justifiquem que os peixes sintam dor. Esse trabalho causou grande polêmica e foi imediatamente atacado por praticamente toda a literatura da área e contribuiu impulsionando uma série de estudos que mostram que os peixes são criaturas sencientes (que percebem ao menos emoções como dor, fome, medo, entre outras similares). Parte importante desses estudos foi desenvolvida por Sneddon (2002, 2003a, b) e Sneddon *et al.* (2003), mostrando as bases fisiológicas e neuroanatômicas que nos auxiliam a considerar os peixes como seres sencientes. Mais que isso, num estudo interessantíssimo, Sneddon (2003b) mostra que quando coloca ácido (um agente comprovadamente indutor de dor em mamíferos) nos lábios de trutas, elas exibem comportamentos de raspar a boca no sedimento e ficam agitadíssimas. Porém, com engenhosidade, mostra que a truta não reage assim (ao contrário, permanece inerte) quando antes do ácido elas recebem injeção de morfina. Ou seja, a morfina bloqueou essa resposta. Como a morfina age em receptores importantes na mediação endógena da dor, é provável que esses peixes possuam receptores para dor e tenham emoção sobre a mesma.

Posteriormente alguns trabalhos de revisão contribuíram muito na demonstração de dor e sensibilidade em peixes (*e.g.* Chadroo *et al.*, 2004; Conte, 2004; Duncan, 2006; Huntingford *et al.*, 2006), embora controvérsias posteriores tenham sido publicadas (Arlinghaus *et al.*, 2007, 2009).

No passado houve tendências em se considerar o bem-estar como oposto ao estado de estresse como enfoca o trabalho de revisão de Duncan (2006). Tal abordagem, no entanto, não foi aceita amplamente porque não é adequada a definição de um processo em termos da ausência de outro. Volpato *et al.* (2007) mostram que o estado de estresse é facilmente caracterizado, pois implica, em última instância, em um conjunto de respostas a uma pressão ambiental que demanda energia (que é conseguida com o estresse fisiológico). No caso do bem-estar, no entanto, esses autores argumentam que não há uma situação metabólica tão definida. O animal pode estar em bem-estar em condições de desafio ou não. Assim, concluem que, no caso do estado de bem-estar, não deve haver um elemento definido passível de seleção natural. Segundo esses autores, isso explica porque não conseguimos encontrar um eixo característico para o estado de bem-estar, ao contrário do que evoluiu no estado do estresse nos vertebrados.

Frente a essa dificuldade, revisões recentes por Dawkins (2006), Duncan (2006) e Volpato *et al.* (2007) enfatizam a necessidade de se conhecer as preferências dos animais na questão do bem-estar. Testes de preferência vêm sendo utilizados há décadas, sendo os primeiros da década de 70 conduzidos por BO Hughes e MS Dawkins (Duncan, 2006), embora não necessariamente enfatizando o bem-estar animal (Brydges & Braithwaite, 2008). O estado de bem-estar depende de como o animal percebe o ambiente em que está e a natureza de suas respostas depende da avaliação cognitiva frente às condições ambientais (Veissier & Boissy, 2007), ou seja, resulta em suas preferências. Volpato *et al.* (2007) detalham os pressupostos lógicos e metodológicos para se considerar o bem-estar em peixes a partir das preferências dos peixes e definem o estado interno de bem-estar como aquele que o animal apresenta quando está em uma condição na qual optou livremente por estar. Assim, aqui enfocamos a abordagem da preferência para o entendimento do bem-estar dos animais.

Uma questão emergente dessa problemática é o conhecimento do quanto uma situação é boa para o animal. Segundo Duncan (2006), enquanto muitos estudos têm enfatizado a diferença entre estados de sofrimento e estados de bem-estar, pouco tem sido feito para se entender as diferenças no estado de bem-estar. Nessa linha, trabalhos atuais

usam o esforço do animal para conseguir determinado objetivo como indicador da importância desse para o animal, porém somente no presente ano foi publicado estudo desse gênero com peixes (Galhardo *et al.*, 2011). Portanto, também avaliamos a tese central de que o esforço realizado pelos peixes para conseguir determinada condição é um indicador da sua motivação para essa condição. Com isso, pressupomos que o esforço seja proporcional à relevância da condição para o animal, podendo ser um indicador de bem-estar.

A presente investigação necessitou do desenvolvimento de etapas prévias à avaliação da tese principal, de forma a melhor subsidiar as condutas experimentais. Assim, inicialmente foram definidos parâmetros de preferência para três recursos: tipo de sedimento, coloração ambiental e intensidade luminosa na cor ambiental preferida. Uma vez definidas essas preferências para cada um desses recursos, a tese central proposta foi avaliada. Assim, inicialmente elucidamos qual desses recursos é o mais importante para o animal, por meio do esforço despendido para obtê-los. Comparamos os resultados dessa metodologia de esforço com a dos testes de preferência/escolha. Posteriormente, avaliamos se o esforço (motivação) do animal aumentava à medida que aumentava o número de recursos, o que era um corolário necessário para a tese proposta. Além disso, comparamos essa motivação para obter esses recursos com a motivação para alcançar alimento, recurso primordial para a sobrevivência.

## **OBJETIVOS**

### *GERAL*

Avaliar a tese de que o esforço dos peixes para conseguir um objetivo é um indicador da motivação proporcional à relevância da condição para o animal, podendo ser um indicador de bem-estar.

### *ESPECÍFICOS*

- Determinar a preferência da tilápia-do-Nilo em relação à granulometria preferencial de sedimento de rio, coloração ambiental e intensidade de luz na cor ambiental preferida;

- Avaliar se existe efeito da hora do dia na escolha, preferência e tomada de decisão em relação a esses itens supracitados;
- Determinar uma metodologia adequada para medir a motivação do peixe para obter determinado objetivo;
- Com a metodologia determinada no objetivo anterior, comparar o esforço realizado pelo peixe para obter um recurso preferencial em relação à obtenção de um recurso primário (alimento);
- Analisar se a somatória de itens de recursos preferenciais aumentaria o esforço despendido pelo animal.

## **MATERIAL E MÉTODOS GERAL**

### *ANIMAIS E MANUTENÇÃO*

Utilizamos alevinos de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (L., 1759), com comprimento padrão na faixa de 6 a 9 cm. Os peixes foram provenientes de sistema de monocultivo e permaneceram em Biotério climatizado cerca de 30 dias antes do início dos experimentos em tanques de 500 L com densidade máxima de 1 peixe/5 L (Capítulos 1 a 3) e em tanques de 100 L com densidade máxima de 2 peixes/ 5 L (Capítulos 4 e 5).

A aeração foi constante, a qualidade da água e a temperatura foram mantidas dentro das condições ideais para a espécie. A fotofase foi ajustada para 12 h de claro (6:00 h às 18:00 h) e 12 h de escuro. A alimentação (Purina®, Campinas-SP) foi diária em torno de 5% da massa corporal de cada peixe oferecida uma única vez tanto no Biotério quanto durante os experimentos.

### *ESQUEMA GERAL DA TESE*

Inicialmente, investigamos itens de preferência da tilápia-do-Nilo em relação a substrato, cor ambiental e intensidade luminosa na cor ambiental preferida (Estudo 1). A partir disso, avaliamos o esforço que esses animais despendem para obter os recursos preferidos: cor ambiental na intensidade de luz preferida e substrato, além de tocas (Estudo

2). Nessa etapa, contrastamos ainda a avaliação da preferência por meio da escolha entre cor, substrato e toca com a preferência avaliada por meio do esforço despendido para conseguir esses recursos (Estudo 2). Complementando esse segundo estudo, avaliamos o efeito aditivo (somatório de itens de preferência para atração) desses itens de preferência sobre o esforço demandado pelo animal (Estudo 3). Esse esforço foi também comparado com aquele despendido pelo recurso alimentar, uma vez que é um recurso fundamental para a sobrevivência (Estudo 3).

### Estudo 1: Análise de preferências (Capítulos 1 a 3)

Utilizamos testes de preferência nos quais os animais puderam escolher entre condições potencialmente agradáveis e outras desagradáveis, de forma a indicar o bem-estar desses indivíduos a partir da perspectiva do animal. A preferência foi inferida da maior frequência que o animal escolhe determinada condição. Também investigamos a consistência da preferência em quatro dias consecutivos e nos períodos manhã e tarde. Além disso, avaliamos se existe efeito do período do dia na tomada de decisão por algum recurso preferencial. Os experimentos foram conduzidos independentemente para avaliar a preferência para as seguintes variáveis: Granulometria preferencial de sedimento de rio (Capítulo 1); Coloração ambiental (Capítulo 2) e Intensidade de luz na cor ambiental preferida (Capítulo 3).

### Estudo 2: Esforço × Preferência (Capítulo 4)

Analisamos o esforço motivacional para obter os recursos preferenciais testados anteriormente (granulometria preferencial de sedimento e cor ambiental amarela) e toca. Tal esforço foi avaliado através da intensidade de toques na porta que dava acesso a esses recursos e na latência para deflagrar o primeiro toque. Avaliamos esse esforço 48 h e 96 h após os peixes serem introduzidos nos aquários. Além disso, toda essa análise foi realizada tanto com o total de peixes, quanto restrita aos que apresentaram preferência 24 h antes de cada avaliação do esforço. Dessa maneira, pudemos ordenar os recursos por prioridade.

Em outro experimento de escolha, comparamos essas duas metodologias: esforço e escolha. A escolha, nesse caso, foi avaliada por meio da frequência de visita nesses recursos quando apresentados concomitantemente.

### Estudo 3: Efeito aditivo de recursos no esforço investido e comparativo com alimento

#### (Capítulo 5)

Testamos se há aumento do esforço motivacional à medida que agrupamos os recursos testados no Estudo 2. Assim, pudemos estabelecer o item de enriquecimento prioritário para esses animais e responder a pergunta: o que é melhor, quantidade ou a qualidade dos recursos? Também comparamos o esforço da tilápia despendido para obter esses recursos (somados ou não) com o esforço para conseguir alimento (recurso primário). Além disso, analisamos se o esforço para obtenção de alimento aumenta entre jejum de 24 e 48 h. A metodologia de avaliação desse esforço foi igual à do Estudo 2.

#### *ÉTICA*

Os estudos desenvolvidos nesta tese estão de acordo com os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA; <http://www.cobea.org.br>) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP, Brasil (Protocolos # 55/08 e 56/08).

## CAPÍTULO 1:

### *Preferência por granulometria de sedimento*

#### **Resumo**

Avaliamos a escolha da tilápia-do-Nilo (*O. niloticus*) por quatro diferentes granulometrias de sedimento de rio ou substrato artificial. Quinze peixes foram isolados individualmente em aquários de vidro divididos em 5 compartimentos de áreas equivalentes. Os peixes eram capazes de escolher qualquer área devido a um corredor de comunicação entre os compartimentos. Uma área continha substrato de PVC e as demais, sedimento de rio de diferentes tamanhos (0,12; 0,57; 1,04 e 1,64 cm). Determinamos a frequência que os peixes visitavam os diferentes sedimentos a cada 5 min em dois períodos de 2 h (manhã e tarde) ao longo de 4 dias. Os sedimentos que o peixe escavou nos quatro dias também foram avaliados. As tilápias visitaram mais o sedimento de rio de 0,57 cm, e o de PVC foi o menos visitado. No entanto, o sedimento de rio de 0,12 cm foi mais escavado que os outros. O padrão de escolha por sedimento foi consistente durante os 4 dias e não foi afetado pelo período, indicando preferência ao invés de escolhas aleatórias. A preferência dos peixes por diferentes tamanhos de sedimento depende da motivação do peixe (forrageamento ou reprodução). Também existe consistência com a teoria do tamanho ótimo de presas, porque eles escolheram o tamanho de sedimento de aproximadamente 60% da amplitude bucal. Além disso, a proporção de peixes decididos (que escolheu apenas um tipo de sedimento) foi maior durante a manhã, sugerindo que a tomada de decisão seja mais efetiva nesse período.

## 1. Introdução

A produção de peixes está sendo associada cada vez mais com as preocupações de bem-estar animal. Nesse contexto, é imperativo determinar se os peixes são mantidos em condições de bem-estar. No entanto, tal determinação continua a ser controversa. Embora alguns autores tenham inspecionado padrões fisiológicos para determinar os estados de bem-estar, outros acreditam que os padrões fisiológicos não necessariamente se relacionam diretamente com o bem-estar e que a estratégia mais importante é entender o que os animais querem (vide revisões de Dawkins, 2006; Duncan, 2006; Volpato *et al.*, 2007). Assim, testes de escolha e preferência podem fornecer informações úteis a respeito da manutenção de peixes em lagos, tanques ou aquários. Um peixe estará em boas condições se permanecer em um ambiente se puder escolher livremente entre as condições (Volpato *et al.*, 2007). Isso desperta o problema de como se determinar as preferências dos peixes.

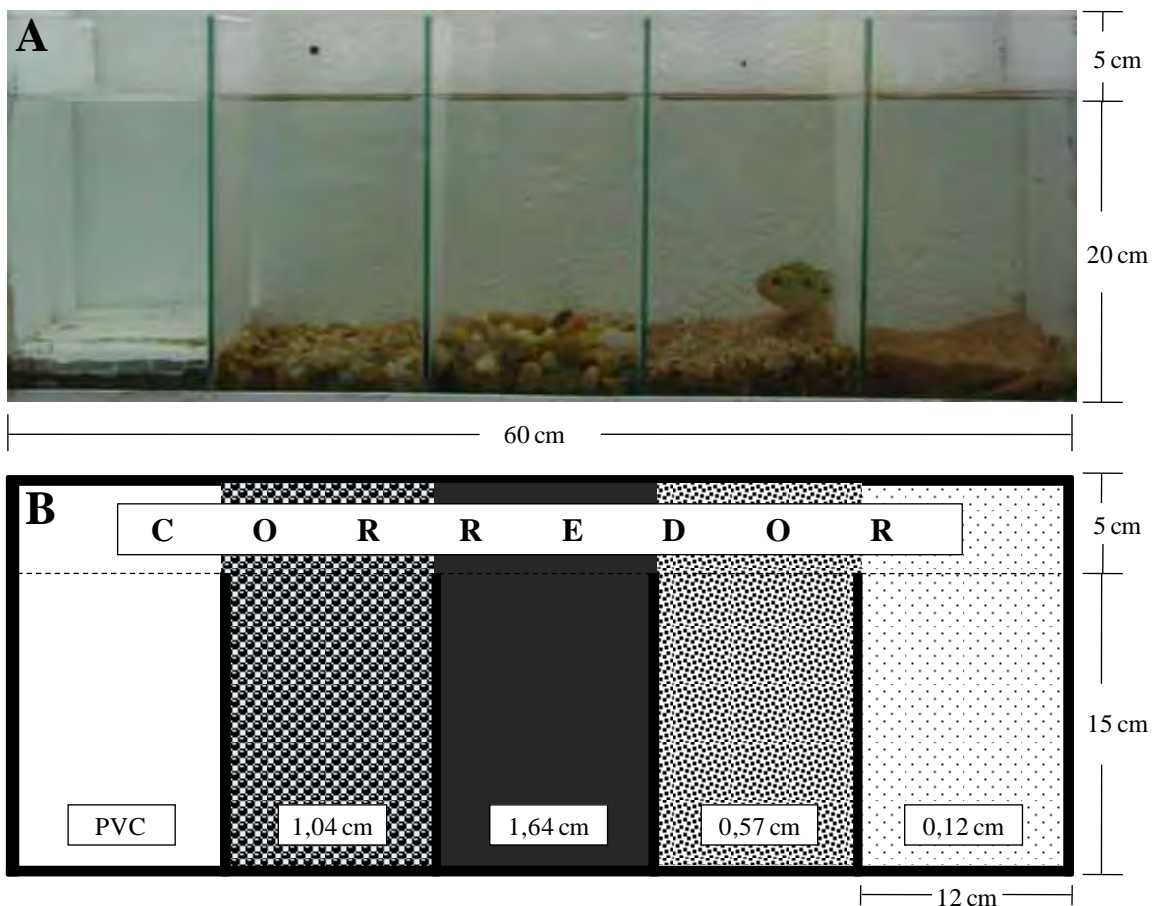
Um sedimento adequado pode aumentar o crescimento, produção e sobrevivência da tilápia-do-Nilo (Uddin *et al.*, 2007), reprodução da tilápia-de-Moçambique (Galhardo *et al.*, 2008, 2009) e sucesso reprodutivo de outra espécie de Cichlidae, *Neolamprologus mondabu* (Takemon & Nakanishi, 1998). Visto que a tilápia faz ninhos para se reproduzir, cavando o sedimento, o tipo disponível desse sedimento provavelmente afeta esse comportamento. Além disso, como os ciclídeos carregam o sedimento com a própria boca, o tamanho desse pode ser relevante. O peso do sedimento foi usado para inferir investimento reprodutivo em tilápia-do-Nilo (Volpato *et al.*, 2004).

Portanto, examinamos a preferência da tilápia-do-Nilo para sedimento de diferentes tamanhos e um substrato artificial (PVC). Analisamos essa preferência no período da manhã e da tarde por motivos de consistência. O tamanho do sedimento escolhido foi de acordo com a abertura da boca do peixe e do contexto comportamental de nidificação ou não. Este estudo aumenta a base de conhecimentos de estudos de preferência que têm sido considerados para as preocupações de bem-estar em peixes (Galhardo *et al.*, 2008, 2009; Mendonça *et al.*, 2010). Além disso, a tilápia do Nilo é uma espécie mundialmente utilizada para fins de aquicultura e de pesquisa.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Delineamento

Avaliamos a preferência entre quatro diferentes granulometrias de sedimento de rio e um substrato artificial de PVC. Testamos 15 espécimes isolados em cinco aquários experimentais, sendo três peixes testados em cada um desses. Os aquários dispunham de compartimentos com esses sedimentos e um corredor que permitia a passagem do peixe para qualquer um deles (Figura 1). Após o tempo de aclimatação de 24 h, a escolha do peixe foi observada pela manhã (9:00 h às 11:00 h) e pela tarde (15:00 h às 17:00 h) por 4 dias consecutivos a cada 5 min.



**Figura 1:** Foto em vista frontal (A) e esquema em vista superior (B) do aquário utilizado para avaliar a preferência da tilápia-do-Nilo por granulometria de sedimento de rio e artificial. Quatro diferentes sedimentos de rio e um artificial (PVC) foram dispostos aleatoriamente em cada compartimento (e na extensão do mesmo no corredor) para cada peixe.

## 2.2. Procedimentos específicos

Quatro compartimentos tinham uma camada de 3 cm de um dos diferentes sedimentos de rio. Uma amostra aleatória do maior diâmetro de 15 unidades de cada sedimento de rio revelou as médias ( $\pm$  desvio padrão das médias - d.p.m.) desses que foram:  $0,12 \pm 0,04$  cm;  $0,57 \text{ cm} \pm 0,07$ ;  $1,04 \pm 0,16$  cm;  $1,64 \pm 0,29$  cm. Os tamanhos dos sedimentos foram significativamente diferentes (ANOVA:  $F_{3,56} = 213.23$ ;  $P < 0.001$ ). Um compartimento foi composto de uma placa de PVC, resultando na mesma altura dos sedimentos ao longo dos compartimentos. Nos cinco aquários utilizados, as posições dos sedimentos foram distribuídas de modo aleatório para evitar interferência na distribuição espacial dos testes de escolha, como recomendado por Volpato *et al.* (2007).

O comprimento padrão (média  $\pm$  d.p.m.) dos peixes foi de  $7,1 \pm 0,7$  cm. Aeração contínua foi disponibilizada no corredor de passagem na frente do compartimento central, e foi retirada 20 min antes de cada período de observação. A aeração foi repostada às 17:00 h de cada dia quando os peixes eram alimentados. A temperatura da água foi registrada após a observação da manhã às 11:00 h de cada dia, sendo de  $22,9 \pm 0,5^\circ\text{C}$ .

## 2.3. Registro e análise de dados

Detectamos os sedimentos que tinham sido escavados até o aparecimento do fundo de vidro (Figura 2). Registramos a posição dos peixes a partir do posicionamento de um dos olhos do mesmo, aquele primariamente observado. Assim, anotamos a posição de cada peixe 25 vezes durante cada período de cada dia, totalizando 375 posições relativas dos 15 peixes. Computamos as proporções de acordo com cada tipo de sedimento e as comparamos entre si pelo Teste de Goodman (1965) dentro da multinomial (período). Também comparamos essas proporções entre as multinomiais manhã e tarde pelo Teste de Goodman (1964).



**Figura 2:** Exemplo do sedimento de 0,12 cm considerado como escavado devido ao aparecimento do vidro.

Também realizamos a comparação independente do dia somente contrastando com o período. Para isso, somamos as opções dos peixes ao longo dos quatro dias de observações para cada período do dia (100 observações em cada período de cada peixe) e comparamos entre os tipos de sedimentos (Goodman, 1965).

Analisamos o perfil de tomada de decisão dos peixes na preferência por sedimento. Dessa maneira consideramos "peixe decidido", aquele que estava presente em apenas um tipo de sedimento, significativamente, mais que nos outros. Os peixes indecisos eram aqueles que não preferiam apenas um sedimento. Comparamos as proporções de peixes decididos e indecisos entre manhã e tarde, usando Teste de Goodman (1965). Também comparamos as proporções de peixes que escavaram os sedimentos entre os diferentes sedimentos que foram escavados, independentemente do dia e período pelo Teste de Goodman (1964, 1965). Consideramos as diferenças significativas quando  $P < 0,05$ .

### 3. Resultados

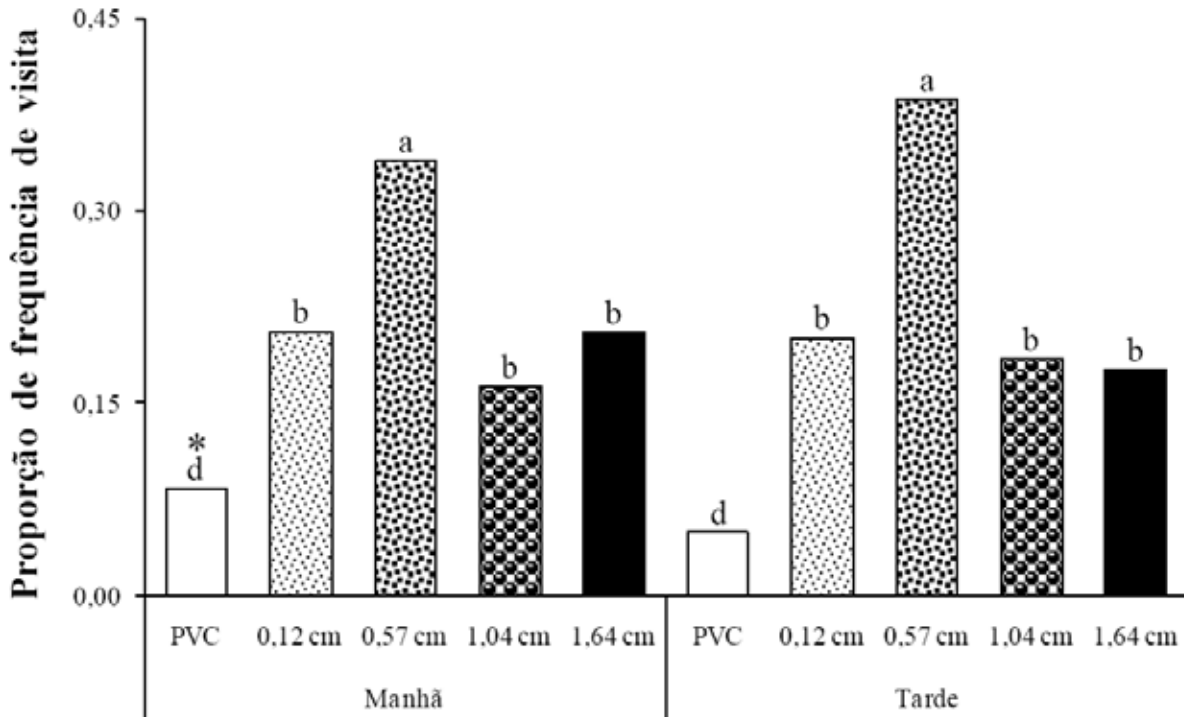
Durante os quatro dias de observação, o comportamento de escavação foi dependente do tamanho do sedimento. Os peixes escavaram principalmente o menor sedimento (0,12 cm; Tabela 1).

**Tabela 1:** Número de peixes por comportamento de escavação (Sim ou Não) em cada tipo de sedimento de rio.

Tamanho de sedimento (cm)	Escavação	
	SIM	NÃO
0,12	13 a*	2
0,57	4 b*	11
1,04	3 b*	12
1,64	0 b*	15

\* indica diferença (Teste de Goodman, 1965; Intervalo de Confiança não inclui o valor zero) entre as variáveis dependentes (classes) SIM e NÃO. Letras diferentes denotam diferença significativa (Teste de Goodman, 1964;  $G_{\text{calculado}} > G_{\text{crítico}} = 2.64$ ) entre as proporções de peixes que escavaram cada sedimento.

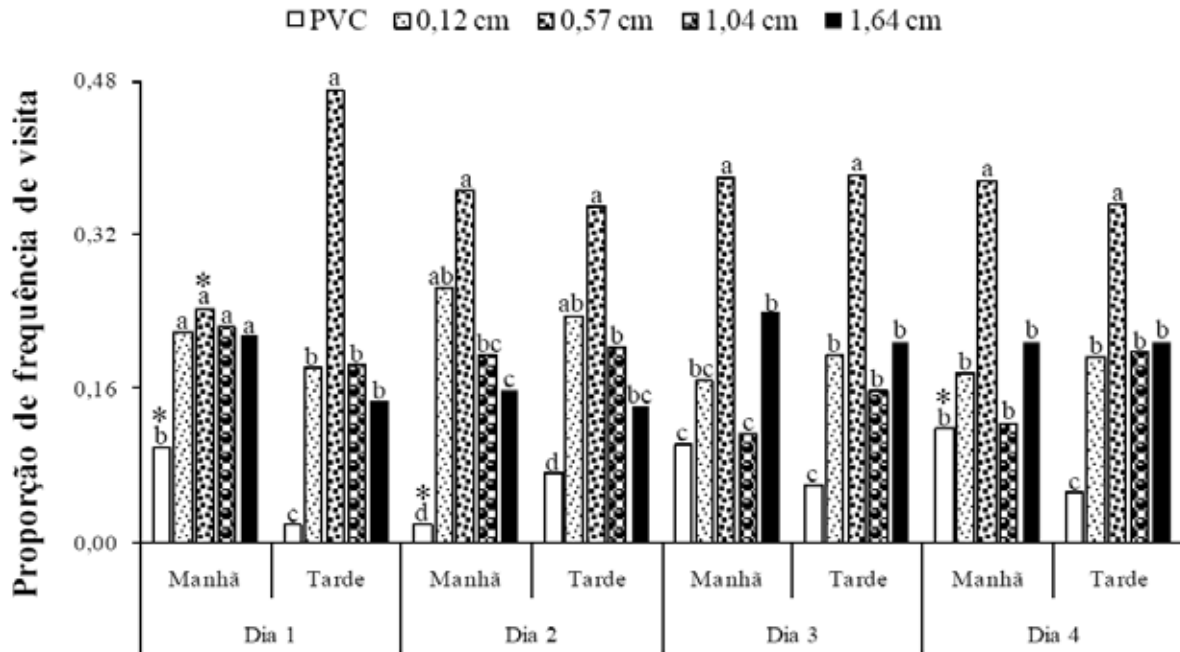
Independentemente do tamanho do sedimento ou hora do dia, a tilápia escolheu um tipo de sedimento de rio com mais frequência do que o substrato de PVC (Figura 3). Entre os sedimentos de rio, os peixes visitaram mais a área do sedimento de 0,57 cm de diâmetro com mais frequência que as outras áreas, independentemente da hora do dia (Figura 3). Existiu diferença na proporção de visita entre os períodos somente para o substrato de PVC, porém ainda foi o menos visitado nos dois períodos.



**Figura 3.** Proporção de escolha por sedimento ( $N = 15$ ). Dados cumulativos de quatro dias para cada período. Letras diferentes acima das colunas indicam diferença num mesmo período (Teste de Goodman, 1965; Intervalo de Confiança não inclui o valor zero para  $A_{\text{crítico}} = 9,76$ ). Asterisco (\*) indica diferença entre manhã e tarde para o PVC (Teste de Goodman, 1964;  $G_{\text{calculado}} > G_{\text{crítico}} = 2,57$ ).

Também observamos que praticamente o mesmo padrão geral de visitação da Figura 3 (o sedimento de 0,57 cm de tamanho foi o mais visitado e o substrato de PVC o menos visitado) ocorreu em cada dia de observação, com exceção da manhã do primeiro dia (Figura 4). Existiram diferenças entre manhã e tarde na proporção de visitas para o substrato de PVC nos dias 1, 2 e 4 (Figura 4). No dia 1 pela manhã essa proporção de visita pelo PVC foi transferida para o sedimento escolhido de 0,57 cm de tamanho. Independentemente dessas diferenças entre manhã e tarde, o padrão de visitação mencionado foi mantido.

A ocorrência de peixes decididos foi mais comum na manhã (Tabela 2). Como a decisão por um sedimento específico pode ser afetada pelo tamanho da boca do peixe, medimos o tamanho máximo dorso-ventral da abertura bucal, sendo de  $0,95 \pm 0,26$  cm.



**Figura 4.** Proporção de escolha por sedimento ( $N = 15$ ) por dia e período observado. Letras diferentes acima das colunas indicam diferença significativa (Teste de Goodman, 1965; Intervalo de Confiança não inclui o valor zero para  $A_{\text{crítico}} = 9,76$ ) num mesmo dia e período. Asterisco (\*) indica diferença no mesmo sedimento em relação ao período da tarde (Teste de Goodman, 1964;  $G_{\text{calculado}} > G_{\text{crítico}} = 2,57$ ).

**Tabela 2:** Perfil de tomada de decisão por período do dia.

Período	Perfil de tomada de decisão <sup>1</sup>		Total
	Decidido	Indeciso	
Manhã	12*	3	15
Tarde	9	6	15

<sup>1</sup>Peixes decididos escolhem somente um sedimento e peixes indecisos mais que um. \* indica diferença entre os perfis de tomada de decisão (Teste de Goodman, 1965; Intervalo de Confiança não inclui o valor zero para  $A = 3,84$ ).

#### 4. Discussão

A tilápia-do-Nilo preferiu sedimento natural de rio ao invés de um artificial. Além disso, a escolha pela granulometria do sedimento dependeu do tamanho da boca dos peixes e do comportamento motivacional. Os peixes visitaram principalmente um sedimento de

tamanho intermediário, uma escolha que possivelmente esteja associada com o tamanho da abertura da boca do peixe. No entanto, o peixe preferiu escavar ninhos no de menor granulometria. Curiosamente, o perfil de tomada de decisão do peixe por um sedimento preferencial depende da hora do dia, mas o padrão de visitação é praticamente independente.

A preferência em peixes tem sido tipicamente avaliada em estudos sobre suas escolhas em testes em que pode escolher uma opção em detrimento de outras (*e.g.* Webster & Hart, 2004; Mendonça *et al.*, 2010). Embora a maioria dos autores utilize os termos “escolha” e “preferência” quase como sinônimos, eles representam respostas diferentes. Preferência tem sido atribuída às escolhas que são consistentes ao longo do tempo (Volpato, 2009; Browne *et al.*, 2010). A escolha é uma seleção de uma ou mais possibilidades, e preferência é inferida a partir de escolhas estáveis e consistentes que refletem uma predisposição em favor de algo (escolha é o fator operacional para inferências sobre a preferência) (Volpato, 2009).

A tilápia-do-Nilo manteve-se principalmente nas áreas contendo sedimento de rio e visitou mais freqüentemente o de tamanho de 0,57 cm (Figura 3). Embora essa escolha para o tamanho do sedimento, não foi detectada na manhã do primeiro dia de observação (Figura 4), ocorreu de forma consistente durante os outros períodos de observação. A ausência de escolha definitiva durante a primeira manhã de observação pode ser devido aos peixes estarem explorando o novo ambiente (Galhardo *et al.*, 2009; Mendonça *et al.*, 2010) ou adaptando-se a outras condições impostas por esse novo ambiente. Detectamos o perfil de escolha, consistentemente, em sete dos seguintes períodos (Figura 4). Essa escolha consistente indica que o peixe tem uma preferência por visitar o sedimento de granulometria de 0,57 cm de tamanho. A preferência consistente ao longo das horas do dia por um tipo de sedimento também foi relatada em *Merlangius merlangus* (Atkinson *et al.*, 2004) e em *Acipenser fulvescens* (Peake, 1999).

A preferência da tilápia-do-Nilo para os vários tamanhos de sedimento foi alterada quando esses peixes faziam ninhos. Tais efeitos também foram descritos por Mendonça *et al.* (2010), que relataram que machos dessa espécie escolhem um tipo de sedimento diferente quando estão motivados para a reprodução. No presente estudo, os dados nos indicam que a escolha de uma granulometria específica de sedimento é afetada pela condição reprodutiva dessa mesma espécie. Esses dados corroboram o fato da tilápia-do-Nilo aninhar-se sobre o sedimento (Lowe-McConnell, 1958; Mendonça & Gonçalves-de-Freitas, 2008).

A amplitude bucal, então analisada, explica porque os sedimentos de 0,12 e 0,57 cm foram os preferidos pela tilápia-do-Nilo. Esses sedimentos foram menores do que a maior

distensão de abertura de boca de 0,95 cm. A escolha de tamanho de unidade de sedimento é dependente do tamanho do peixe e afeta a distribuição espacial dos peixes no ambiente (Phelan *et al.*, 2001; Stoner & Abookire, 2002). Como os dois tamanhos de sedimentos escolhidos foram menores que a máxima abertura bucal da tilápia-do-Nilo, a seleção pode estar envolvida na capacidade de carregar unidades de sedimento pelos peixes, uma vez que é realizada pela boca. A teoria do tamanho de presa ótima está em 60% da amplitude bucal do peixe predador (vide revisão de Gill, 2003). Aqui, 60% da amplitude bucal equivale a 0,57 cm, exatamente o mesmo tamanho de sedimento mais visitado. Assim, o tamanho do sedimento preferencial é consistente com a predição da teoria do tamanho ótimo de presa.

Uma questão interessante, no entanto, é: por que a tilápia-do-Nilo escolhe o maior dos sedimentos que ainda seja menor do que a sua amplitude bucal, mas escolhe aninhar-se num sedimento menor ainda? As razões para essas escolhas diferentes podem ser respondidas por considerar a possibilidade de forrageamento dos peixes e conservação de energia. Webster & Hart (2004) relataram que o *Gasterosteus aculeatus* prefere um sedimento mais complexo, a areia (o sedimento de 0,12 cm é praticamente uma areia em nosso estudo), pois torna as presa mais fáceis de serem detectadas ou capturadas quando o jejum é imposto como fator motivador. No presente estudo, os peixes estavam em jejum por pelo menos 16 h no período de observação da manhã e de 22 h à tarde. Portanto, os peixes, provavelmente, estavam motivados a alimentar-se, especialmente durante o período de observação da tarde. Em tilápias isoladas, o sedimento de rio oferece oportunidades adicionais para forrageamento e exploração, onde freqüentemente é observada tocando, arrastando ou carregando unidades de sedimento com a boca (Galhardo *et al.*, 2009). Essa constatação foi reforçada porque os peixes forragearam em todos os sedimentos no presente estudo. As presas podem ser detectadas quando unidades de sedimento são removidas pelo peixe quando motivado a alimentar-se. Nesse sentido, quando a alimentação é a principal motivação, o peixe provavelmente prefere o sedimento de maior porte que ainda pode ser movido por sua boca. No entanto, para os peixes motivados para construção de ninhos o menor sedimento é preferível, pois nidificação requer a remoção de grandes quantidades de sedimento, o que pode ser energeticamente dispendioso para os peixes. Mendonça *et al.* (2010) também constataram que a tilápia-do-Nilo prefere construir ninho na areia.

Outro comportamento intrigante que detectamos foi a maior freqüência de peixes decididos pela manhã. Uma vez que observamos os mesmos animais em ambos os períodos do dia, essa resposta pode expressar uma mudança interna na tomada de decisões. O mesmo

efeito do tempo do dia também foi detectado em tilápia-do-Nilo para outras escolhas, como pareamento de acordo com o tamanho do coespecífico (Gestich & Volpato, em preparação<sup>1</sup>), coloração ambiental (vide Capítulo 2) e intensidade de luz (vide Capítulo 3). Embora essa variação na tomada de decisão seja um fenômeno muito novo identificado nos peixes, o grau de atenção em ratos é relatado por variar dentro do ciclo circadiano (Hajós *et al.*, 2008). A atenção é um componente importante para efetuar escolhas.

Os resultados do presente estudo, provavelmente, podem ser úteis para o cultivo de tilápia-do-Nilo, pois o crescimento compete pela energia que pode ser canalizada para outros propósitos, tais como o forrageamento (Webster & Hart, 2004) e a reprodução (Mendonça *et al.*, 2010) em sedimento de rio. Além disso, a capacidade de alterar a tomada de decisões com base no período do dia também pode sugerir diferentes momentos para alimentar ou manipular esses animais em cativeiro. Entretanto, maiores investigações são necessárias para uma melhor compreensão do fator motivacional envolvido na escolha e na preferência dos peixes por sedimento. Independentemente das razões de escolha, o sedimento é um recurso importante para garantir o bem-estar da tilápia-do-Nilo (Galhardo *et al.*, 2008, 2009; Mendonça *et al.*, 2010). Além disso, a preferência de um peixe por um tamanho específico de sedimento pode depender da motivação do peixe e estado interno.

Portanto, demonstramos que a granulometria do sedimento é importante para as preocupações de bem-estar da tilápia-do-Nilo. Essa espécie prefere visitar, constantemente, a granulometria de sedimento próximo a 60% da amplitude bucal, preferência que pode estar associada com o forrageamento. No entanto, a tilápia prefere fazer ninho na areia (tamanho mínimo de sedimento) para poupar energia em contextos reprodutivos. Além disso, a tomada de decisão da espécie na visita por sedimento é mais persuasiva na manhã, porém não é capaz de alterar o padrão geral dessa visitação ao longo dos dias e hora do dia.

---

<sup>1</sup>Gestich CC, Volpato GL. Choice for paring with conspecifics in the Nile tilapia: do animal size and time of the day matter?

## CAPÍTULO 2:

### *Preferência por coloração ambiental*

#### **Resumo**

Avaliamos a preferência da tilápia-do-Nilo (*O. niloticus*) por cor ambiental e se existe influência do período do dia nessa preferência e na tomada de decisão. Apresentamos cinco compartimentos de diferentes cores de iluminação (branca, azul, verde, vermelha e amarela; ~ 300 lux) para 13 ( $7,2 \pm 0,3$  cm de comprimento padrão) peixes isolados. Os aquários possuíam um corredor (luz branca, ~ 850 lux) que permitia ao peixe deslocar-se para qualquer dos compartimentos. Observamos a posição do peixe a cada 5 min pela manhã (9:00 h às 11:00 h) e tarde (15:00 h às 17:00 h), por 4 dias consecutivos. A tilápia escolheu as cores ao invés do corredor. Das cores, escolheu a amarela em relação à branca e as demais cores foram, igualmente, pouco escolhidas. Esse padrão de resposta foi constante ao longo dos dias e períodos, mostrando que não se trata de escolhas pontuais, mas preferência. Assim, a tilápia prefere ambiente de cor amarela. A tomada de decisão indica ser mais expressiva pela manhã.

## 1. Introdução

Itens de enriquecimento ambiental podem proporcionar saúde, bom desempenho e desenvolvimento aos animais, mas quando mal empregados podem prejudicar esses parâmetros e, conseqüentemente, o bem-estar dos indivíduos. Embora o enriquecimento ambiental proporcione tais melhorias no bem-estar, pouca atenção tem sido direcionada para animais aquáticos, exceto mamíferos (Williams *et al.*, 2009). Além disso, a preocupação com o bem-estar dos peixes é uma necessidade emergente para garantir a saúde e conforto dos animais e o enriquecimento ambiental pode ser uma importante técnica nesse quesito.

Aspectos filosóficos sobre o que realmente significa bem-estar e diferentes tipos de metodologias para avaliá-lo em peixes ainda são controversos (Volpato *et al.*, 2007; Veissier & Forkman, 2008). No entanto, a abordagem sobre as preferências dos animais está se tornando um bom método para avaliar o bem-estar (Dawkins, 2006; Duncan, 2006; Ashley, 2007; Volpato *et al.*, 2007), uma vez que o estado de bem-estar depende de como o animal percebe o ambiente e suas respostas são provenientes de avaliações cognitivas dessa percepção (Veissier & Boissy, 2006). Vários fatores têm sido testados com sucesso por testes de preferência e de escolha em peixes, como sedimento (Webster & Hart, 2004), itens alimentares (Felicio *et al.*, 2006), temperatura (Mortensen *et al.*, 2007) e cor dos alimentos (Spence & Smith, 2008). Assim, para oferecer o enriquecimento ambiental que proporcione bem-estar, é interessante utilizar itens de preferência dos peixes. Isso ainda torna-se mais primordial, pois geralmente tais itens são escolhidos a partir de referenciais antropomórficos (vide a variabilidade de ornamentos de aquários disponíveis em lojas) ao invés de se considerar o que os peixes realmente o preferem.

Como nos peixes a cor ambiental é um dos fatores que afeta o comportamento (Marchesan *et al.*, 2005; Owen *et al.*, 2010), o desempenho (Papoutsoglou *et al.*, 2000; Ruchin 2004; Karakatsouli *et al.*, 2007a, b, 2010), a ingestão alimentar (Strand *et al.*, 2007), a sobrevivência (Tamouzouzt *et al.*, 2000), a reprodução (Volpato *et al.*, 2004) e a resposta ao estresse (Volpato & Barreto, 2001; Barcellos *et al.*, 2006, 2009), é possível que tenha implicações sobre o bem-estar desses animais. Porém pouco se sabe sobre a preferência dos peixes em relação à cor ambiental.

Cada espécie de peixe necessita de diferentes requisitos e mostra diferentes respostas fisiológicas e comportamentais a diversos fatores (vide revisões de Huntingford *et al.*, 2006;

Ashley, 2007). Chandroo *et al.* (2004) e Conte (2004) ressaltam a importância de fatores espécie-específicos para os estudos de bem-estar. A cor ambiental é um bom exemplo dessa especificidade, onde seus efeitos no bem-estar dos peixes são dependentes da espécie estudada (vide discussões em Volpato & Barreto, 2001; Volpato *et al.*, 2004; Marchesan *et al.*, 2005).

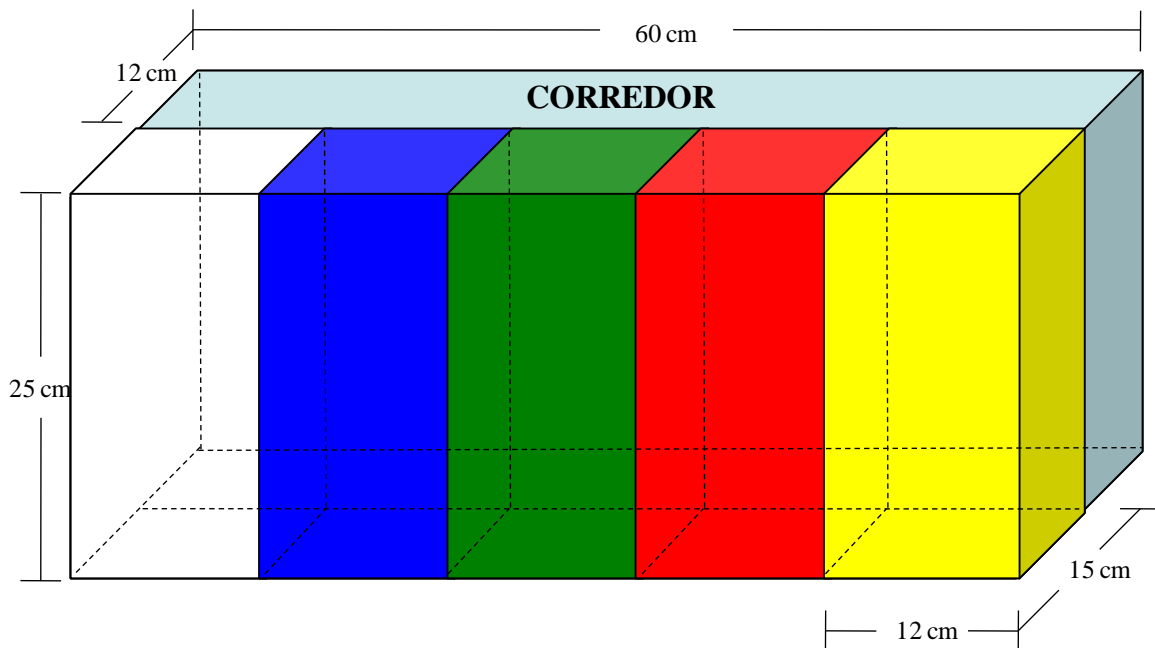
Enquanto a escolha é uma resposta pontual, a preferência só é acessada através de escolhas consistentes ao longo do tempo (Volpato, 2009; Browne *et al.*, 2010). Assim, no presente estudo, avaliamos a preferência da tilápia-do-Nilo por coloração ambiental em quatro dias consecutivos. Como o ritmo diário dos peixes pode variar (Volpato & Trajano, 2006) e o grau de atenção (importante aspecto em escolhas) pode ser modulado por esse ritmo ao menos em ratos (Hajós *et al.*, 2008), investigamos também como essas escolhas se comportam no período da manhã e da tarde.

Embora a preferência por coloração ambiental da tilápia-do-Nilo já tenha sido relatada (Luchiari *et al.*, 2007), há variabilidade individual nessas preferências. Além disso, pouco se sabe sobre os fatores interferentes nessa escolha, de forma que optamos por determinar novamente essa preferência nas condições de nosso estudo. Isso se tornou ainda mais necessário tendo em vista que essa informação é utilizada nas montagens experimentais no seguimento desta tese.

## **2. Material e Métodos**

### *2.1. Delineamento*

Avaliamos a preferência pelas seguintes cores ambientais: azul, branca, vermelha, amarela e verde. Treze peixes foram isolados por 24 h no aquário teste (Figura 5). Em seguida, registramos a cada 5 min o compartimento em que o peixe estava durante 2 h pela manhã (9:00 h às 11:00 h) e 2 h à tarde (15:00 h às 17:00 h), ao longo de 4 dias consecutivos. Para tanto, 5 aquários teste foram construídos, sendo 3 peixes testados em cada um (dois peixes foram perdidos por razões técnicas). Cada aquário compunha uma disposição aleatória de cores, de forma a minimizar efeitos espaciais nas escolhas. A preferência foi obtida da avaliação da proporção de visitas em cada cor nos períodos de observação.



**Figura 5:** Esquema do aquário utilizado para avaliar a preferência por coloração ambiental.

## 2.2. Procedimentos específicos

Os aquários ficaram sob luz fluorescente branca constante (4 tubos de 40 W, a 150 cm de altura dos aquários) e os compartimentos foram cobertos com camadas de papel celofane nas respectivas cores, exceto a cor branca que provinha de papel vegetal (Figura 6). Esses papéis foram adicionados tanto na frente do aquário, quanto em cima de cada compartimento. Números diferentes de camadas de papel foram adicionados e obteve-se uma incidência luminosa igual entre os compartimentos de diferentes cores (ANOVA:  $F_{4,20} = 1,99$  e  $P = 0,14$ ), sendo a intensidade média ( $\pm$  d.p.m.) de luz igual a  $296 \pm 5$  lux (vermelho =  $293 \pm 6$ ; branco =  $295 \pm 4$ ; azul =  $295 \pm 5$ ; verde =  $296 \pm 5$ ; amarelo =  $301 \pm 3$ ). A intensidade média ( $\pm$  d.p.m.) de luz no corredor foi de  $848 \pm 29$  lux, procurando-se evitar que o peixe permanecesse nessa área.



**Figura 6:** Foto (vista frontal) do aquário utilizado para avaliar a preferência por coloração ambiental.

O comprimento padrão médio ( $\pm$  d.p.m.) dos peixes foi de  $7,2 \pm 0,3$  cm. Aeração contínua situava-se no corredor em frente ao compartimento central. Retiramos essa aeração 20 min antes de cada período de observação e, ao término desses períodos, recolocamos na mesma posição. Oferecemos alimento diariamente após o último período de observação, às 17:00 h. A temperatura média ( $\pm$  d.p.m.) durante o experimento foi de  $22,7 \pm 1,5^\circ\text{C}$ .

### 2.3. Registro e análise de dados

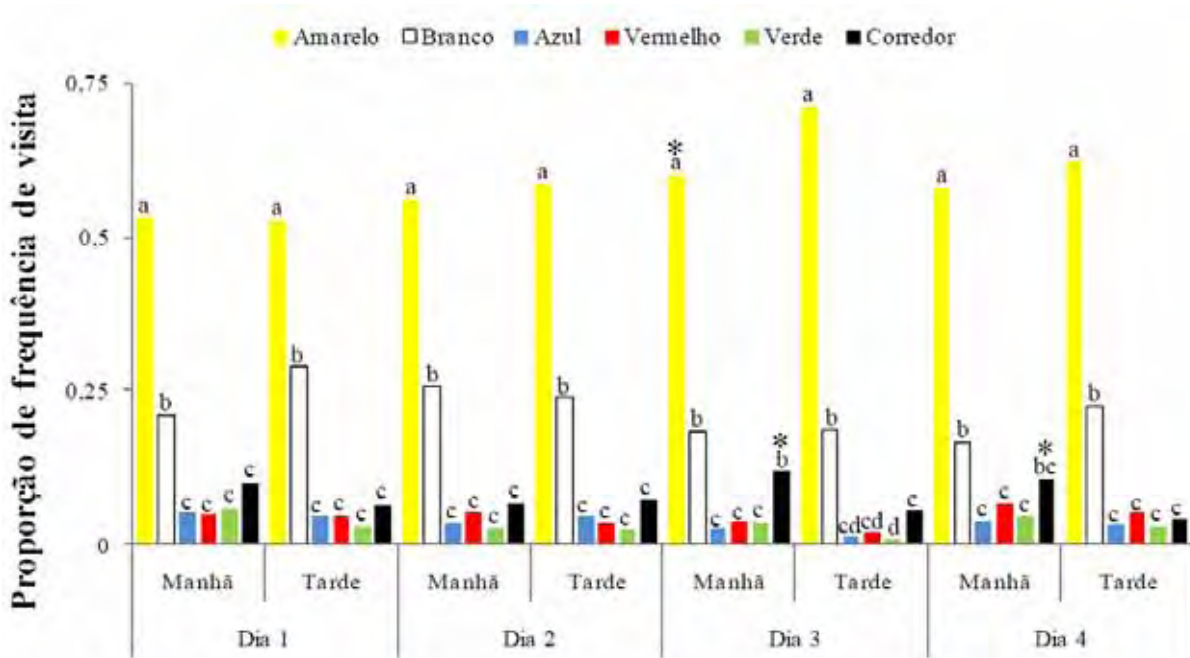
Registramos a posição dos peixes relativa ao compartimento em que se encontrava o olho do animal mais facilmente visualizado pelo observador no momento de registro. Desse modo, anotamos a posição de cada peixe 25 vezes em cada período (manhã e tarde) de cada dia, totalizando 325 marcações dos 13 peixes. Comparamos as proporções de visita entre as cores e corredor em cada período pelo Teste de Goodman (1965) para dados dentro da multinomial (período). Também confrontamos essas proporções entre manhã e tarde pelo Teste de Goodman (1964) para comparações entre multinomiais.

Também realizamos a análise de preferência contrastando a cor e o período, independentemente do dia. Assim, somamos as opções dos peixes ao longo dos quatro dias de observações em cada período do dia (1300 observações de todos os peixes) e comparamos as proporções da mesma maneira que a descrita acima.

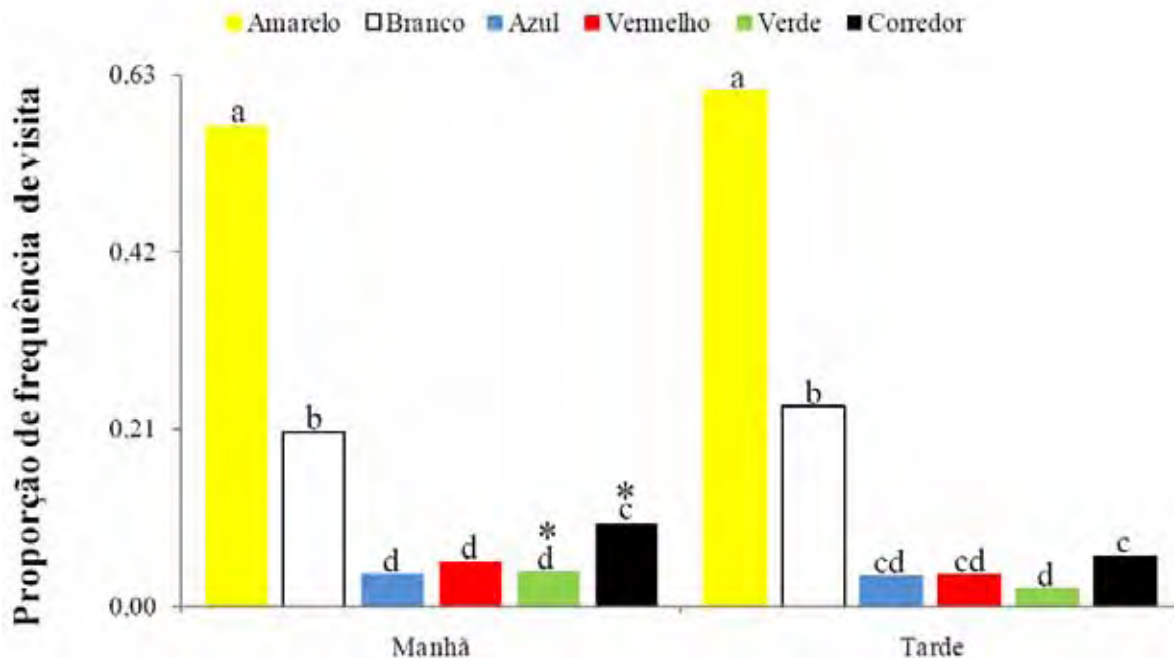
Considerando-se o perfil de resposta dos peixes, identificamos peixes “decididos” e peixes “indecisos”. Quando um peixe escolheu significativamente uma cor ou o corredor em detrimento das outras opções, foi definido como "peixe decidido", caso contrário, o peixe foi considerado como "indeciso". Para isso, somamos a frequência de escolha dos quatro dias em cada período e avaliamos entre as cores e o corredor pelo Teste de Goodman (1965). Posteriormente, confrontamos as proporções do número de peixes decididos e indecisos em cada período pelo Teste de Goodman (1965). Todas as análises estatísticas consideram  $\alpha = 0.05$ .

### **3. Resultados**

O amarelo foi escolhido primariamente, o branco foi a segunda opção e as outras três cores (vermelho, azul e verde) foram igualmente menos escolhidas nos dois períodos dos quatro dias observados (Figura 7). Também observamos esse padrão de escolha somando-se a frequência nos quatro dias, sendo igual pela manhã e tarde (Figura 8). Além disso, a tilápia ficou, proporcionalmente, mais vezes nos compartimentos coloridos do que no corredor, no somatório dos 4 dias de observação, mesmo corrigindo essas frequências pelo volume dessas áreas (Intervalo de Confiança não inclui o valor zero para  $A_{\text{crítico}} = 3,84$ ; Teste de Goodman, 1965). As proporções de frequência foram de 0,92 nos compartimentos e 0,08 no corredor pela manhã, e de 0,95 nos compartimentos e 0,05 no corredor à tarde.



**Figura 7.** Proporção de escolha por cor ambiental ( $N = 13$ ) por dia e período observado. Dados absolutos de proporção de 13 peixes. Letras diferentes acima das colunas indicam diferença significativa (Teste de Goodman, 1965; Intervalo de Confiança não inclui o valor zero para  $A_{\text{crítico}} = 10,17$ ) num mesmo dia e período. Asterisco (\*) indica diferença para a mesma cor ou corredor em relação ao período da tarde (Teste de Goodman, 1964;  $G_{\text{calculado}} > G_{\text{crítico}} = 2,64$ ).



**Figura 8.** Proporção de escolha por cor ambiental ( $N = 13$ ). Dados cumulativos de quatro dias para cada período. Letras diferentes acima das colunas indicam diferença num mesmo período (Teste de Goodman, 1965; Intervalo de Confiança não inclui o valor zero para  $A_{\text{crítico}} = 10,17$ ). Asterisco (\*) indica diferença na mesma cor ou corredor em relação ao período da tarde (Teste de Goodman, 1964;  $G_{\text{calculado}} > G_{\text{crítico}} = 2,64$ ).

A proporção de peixes decididos foi maior que a de indecisos somente pela manhã (Tabela 3).

**Tabela 3:** Perfil de tomada de decisão por período do dia.

Período	Perfil de tomada de decisão <sup>1</sup>		Total
	Decidido	Indeciso	
Manhã	10*	3	13
Tarde	9	4	13

<sup>1</sup>Peixes decididos escolhem somente uma condição (cor ou corredor) e peixes indecisos mais do que uma. \* indica diferença entre os perfis de tomada de decisão (Teste de Goodman, 1965; Intervalo de Confiança não inclui o valor zero para  $A_{\text{crítico}} = 3,84$ ).

#### 4. Discussão

Aqui mostramos que a tilápia-do-Nilo prefere apenas a cor amarela. Essa preferência não se altera entre os períodos de manhã e tarde, sugerindo não apresentar flutuação rítmica. Além disso, o grau de decisão dos peixes para as escolhas parece maior no período da manhã.

Volpato (2009) e Browne *et al.* (2010) ressaltam que muitos autores usam os termos escolha e preferência como sinônimos, porém não deveriam ser tratados dessa maneira. Isto é devido ao fato de ser intuitivo considerarmos que escolhas eventuais aconteçam, mas que a persistência de uma mesma escolha em períodos subsequentes represente algum tipo de preferência, indicando prioridade. Considerando essa definição, vimos que a tilápia não apenas escolheu a cor amarela em alguns testes, mas a prefere consistentemente (Figura 7). Esse resultado, importante nesta tese para a continuidade dos estudos, corrobora o estudo anterior (Luchiari *et al.*, 2007), o que torna essa cor um estímulo importante para entendermos o papel do esforço na compreensão da motivação para as escolhas em peixes (Capítulos 4 e 5).

Em estudos sobre a influência da luz ambiental na vida dos animais, ao menos duas variáveis são de relevância: o comprimento de onda (que indica a cor) e a intensidade

luminosa (Boeuf & Bail, 1999). Neste estudo, os efeitos obtidos decorrem da cor da luz, uma vez que a intensidade luminosa foi igual entre as cores. Assim, a preferência da tilápia pela cor amarela independe da intensidade luminosa. Mesmo assim, como será visto no próximo estudo (Capítulo 3), sob luz amarela a tilápia prefere determinadas intensidades luminosas.

Conforme vimos, a tilápia escolheu, predominantemente, os compartimentos coloridos em relação ao corredor. A análise corrigindo as frequências de permanência por volume mostrou claramente essa escolha. No caso do corredor, além de ter luz branca, possuía também um espaço maior. Porém, a alta intensidade luminosa desse local deve ter sido evitada pela tilápia. Quando comparamos as proporções de visitas na cor branca do corredor contra as visitas no compartimento branco (Figuras 7 e 8), notamos que os peixes visitaram mais o compartimento branco que, embora com menor área, possuía a menor intensidade luminosa. Essa interpretação é corroborada no estudo seguinte (Capítulo 3) em que a tilápia escolhe baixas intensidades luminosas quando na cor amarela.

Uma questão que ressalta é sobre o que leva a tilápia a escolher a cor amarela e qual seria a cor que mais evita. Nesse aspecto, podemos apenas tecer algumas considerações, porém mais estudos são necessários. Spady *et al.* (2006) determinaram a presença de sete genes da opsina e suas respectivas absorbâncias máximas ( $\lambda_{max}$ ) na tilápia-do-Nilo, como segue: *SWS1* (360 nm), *SWS2b* (423 nm), *SWS2a* (456 nm), *Rh2b* (472 nm), *Rh2a $\beta$*  (518 nm), *Rh2a $\alpha$*  (528 nm) e *LWS* (561 nm). Essas absorbâncias máximas nos sugerem a faixa de luz visível para a tilápia (limite de 360 a 561 nm). Note que as cores amarela (545 nm), azul (535 nm) e verde (525 nm) estão dentro dessa faixa. Porém, a absorbância média da cor vermelha (600 nm) fica acima do limite máximo da tilápia, o que sugere que nessa cor sua acuidade visual seja baixa. Por outro lado, as outras cores não escolhidas (azul e verde) estão na faixa de acuidade da tilápia. Mais ainda, a cor azul traz efeitos benéficos para essa espécie, tanto na proteção contra estresse (Volpato & Barreto, 2001) quanto na reprodução (Volpato *et al.*, 2004). A cor verde, por outro lado, se caracteriza por uma ampla faixa no espectro de luz. Portanto, nos parece que, dessas cores, o vermelho seja a que maior prejuízo possa trazer para a espécie (baixa acuidade visual), o que se coaduna com sua baixa escolha. As outras cores, azul e verde, também com baixa escolha, não têm tais limitações. Reforçando a idéia de que a cor vermelha seja a menos conveniente para a tilápia, temos que essa cor parece aumentar demanda de estresse. Em um estudo em nossos laboratórios, a cor vermelha aumentou a ingestão alimentar, mas esse aumento não resultou em ganho de peso e nem em aumento na conversão alimentar, com os autores sugerindo que a energia resultante

foi deslocada para atender demandas de estresse (Bovi *et al.*, em preparação<sup>2</sup>). Além disso, outro estudo dos nossos laboratórios mostra que a tilápia mantida em luz vermelha por uma semana apresenta frequência ventilatória (parâmetro indicativo de estresse, Barreto & Volpato, 2006) mais alta que os valores obtidos por Volpato & Barreto (2001) para peixes mantidos nas cores azul, amarelo e branco (Maia & Volpato, em preparação<sup>3</sup>). De fato, Ruchin (2004) mostrou que a cor vermelha induz mudanças no metabolismo dos peixes, incluindo o crescimento. A luz vermelha também pode aumentar a heterogeneidade de tamanho na carpa-espelho (Karakatsouli *et al.*, 2010) e também na espécie alvo do nosso estudo (Luchiari & Freire, 2009). Até então, somente uma publicação cita algum efeito positivo da cor vermelha em peixes, mas não totalmente claro. As carpas mantidas em baixa densidade nessa cor têm efeito positivo no crescimento, mas tem efeito negativo quando em alta densidade (Karakatsouli *et al.*, 2010).

Em conclusão, vemos que a cor amarela é preferida pela tilápia-do-Nilo e temos argumentos indicativos de que a cor vermelha seja a mais evitada. Disso, sugerimos que estudos sobre a importância fisiológica da cor amarela sejam desenvolvidos nessa espécie, pois tais efeitos foram vistos apenas na cor azul, sem comparação com a cor amarela.

Outro resultado intrigante do presente estudo é que a tomada de decisão dos mesmos peixes é mais evidente no período da manhã na preferência por cor. Embora essa diferença tenha sido significativa, ela decorre de apenas um único peixe (vide Tabela 3), o que requer cautela. No entanto, esse mesmo padrão a favor do período da manhã foi visto de forma consistente no estudo da preferência por granulometria de sedimento (Capítulo 1) e na escolha de intensidade luminosa na cor amarela (Capítulo 3). Além disso, na escolha por pareamento de acordo com tamanho do coespecífico, Gestich & Volpato (em preparação<sup>1</sup>) mostraram que os peixes são mais decididos na tomada de decisão no período da manhã. Essas constatações, possivelmente, decorram do grau de atenção desses animais ser maior no período da manhã. Embora não tenhamos tais informações em peixes, sabe-se que o grau de atenção varia com o ritmo circadiano em ratos (Hajós *et al.*, 2008).

---

<sup>2</sup>Bovi TS, Freitas RHA, da Silva DF, Giaquinto PC, Delicio HC, Volpato GL. Red light stimulates feeding but not growth in Nile tilapia.

<sup>3</sup>Maia CM & Volpato GL. Environmental light color reduces confinement induced ventilatory frequency in the fish Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).

## CAPÍTULO 3:

### *Preferência por intensidade de luz amarela*

#### **Resumo**

Investigamos a preferência da tilápia-do-Nilo (*O. niloticus*) por intensidade luminosa na cor amarela (cor preferencial da espécie) e o efeito do período nessa preferência e na tomada de decisão. Dois experimentos distintos ( $N = 14$  cada) apresentavam espectros de intensidade de luz diferentes: de 189 a 689 lux (primeiro experimento) e de 61 a 197 lux (segundo experimento). Avaliamos a frequência de visita em 5 compartimentos com diferentes intensidades luminosas, sendo esses interconectados por um corredor onde o peixe deslocava-se livremente. Registramos a posição dos peixes a cada 5 min, das 9:00 h às 11:00 h e das 15:00 h às 17:00 h por 4 dias consecutivos em cada experimento. Verificamos que a tilápia preferiu constantemente e, independentemente do período, a menor intensidade de luz apresentada no primeiro experimento (189 lux). Nesse experimento também não existiu efeito do período na tomada de decisão. No segundo experimento, a preferência é contundente somente pela manhã por 81 lux e a tarde o número de animais indecisos é maior, portanto não escolhendo e não optando por uma intensidade de luz específica. Assim, especulamos a hipótese de que isso ocorra à tarde possivelmente pela maior atividade exploratória da espécie nesse período, porém somente quando as intensidades de luz não são aversivas e não tão discrepantes entre si, como apresentado no segundo experimento.

## 1. Introdução

Muitos animais dependem de luz para a sobrevivência. No ambiente aquático, devem ser consideradas a “qualidade” da luz, que significa diferentes comprimentos de onda que são absorvidos pela água, e a “quantidade” de luz, que é a intensidade de luz (Boeuf & Bail, 1999). Esses dois aspectos influem no crescimento (Boeuf & Bail, 1999; Han *et al.*, 2005; Karakatsouli *et al.*, 2007a), na sobrevivência (Tamazouzt *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2005), na reprodução (Ridha & Cruz, 2000; Volpato *et al.*, 2004), no estresse, no bem-estar (Barcellos *et al.*, 2006, 2009; Karakatsouli *et al.*, 2007b, 2008) e no comportamento (Marchesan *et al.*, 2005; Owen *et al.*, 2010), porém poucos trabalhos enfocam a preferência do animal em relação a esses itens. Além disso, como os efeitos são espécie-específicos tanto para o quesito “qualidade” (Volpato *et al.*, 2004) quanto para “quantidade” (Han *et al.*, 2005), é importante que sejam investigados, ao menos, nas espécies mantidas em cativeiro.

A tilápia-do-Nilo (*O. niloticus*) é uma das espécies mais importantes na aquicultura industrial (El-Sayed & Kawanna, 2007) e largamente utilizada em laboratórios para pesquisas científicas, mas aspectos que envolvem seu bem-estar ainda são incipientes. A qualidade de luz tem alguns efeitos nessa espécie. Por exemplo, a luz azul previne estresse (Volpato & Barreto, 2001) e aumenta reprodução (Volpato *et al.*, 2004), o vermelho aumenta ingestão alimentar, mas não converte em crescimento e, provavelmente, induza estresse (Bovi *et al.*, em preparação<sup>2</sup>); e a luz amarela é a preferencial da espécie (vide Capítulo anterior). Em contrapartida, são escassos os estudos que avaliam os aspectos em torno da quantidade de luz nessa espécie (*e.g.* Ridha & Cruz, 2000).

A grande maioria dos trabalhos publicados não menciona a intensidade de luz utilizada nos experimentos e/ou manutenção prévia aos experimentos. No caso de estudos com tilápia-do-Nilo, isso também ocorre e, daqueles que mencionam a intensidade de luz, a amplitude é bastante variada. Por exemplo, encontramos estudos com intensidades luminosas em torno de 100 lux (*e.g.* Volpato *et al.*, 2004, 2009; Luchiari & Freire, 2009), de 250 à 600 lux (*e.g.* Volpato & Barreto, 2001; Barreto & Volpato, 2006, 2007; Delício *et al.*, 2006) e 2500 lux (Ridha & Cruz, 2000; El-Sayed & Kawana, 2004, 2007). Assim, como diferentes espectros de intensidade de luz são utilizados e podem ter efeitos em vários parâmetros de produção e bem-estar, é interessante conseguir uma faixa mais estreita de intensidade de luz padrão para manutenção das espécies. Além disso, uma ampla variedade de intensidades de luz na manutenção dos animais pode dificultar comparações entre os estudos, e ainda

comprometer o animal quando essa intensidade não for adequada. Diferentes condições e enriquecimentos ambientais de peixes utilizados em laboratório podem condicionar especificidades às conclusões dos estudos e, portanto, precisam ser melhor padronizadas (vide revisão de Williams *et al.*, 2009). Em revisão recente, Villamizar *et al.* (2010) apontam que o conhecimento espécie-específico sobre a intensidade de luz é escasso e ainda comparações dos estudos são problemáticas, pois utilizam-se de condições, protocolos e sistemas de iluminação variados.

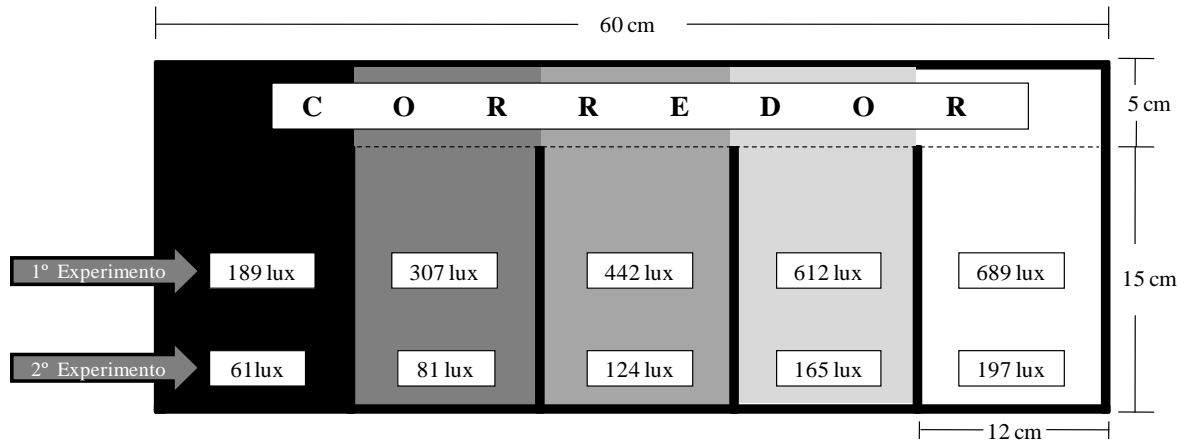
Uma vez que a qualidade e a quantidade de luz são fatores importantes que agem sobre os animais, e que a tilápia-do-Nilo prefere a qualidade amarela, nesta etapa investigamos a preferência por quantidade de luz (intensidade) na coloração ambiental preferida (amarela). Avaliamos essa resposta ao longo de quatro dias consecutivos para minimizar a possibilidade de detectar apenas escolhas esporádicas, mas preferências (vide Volpato, 2007, 2009; Volpato *et al.*, 2007; Browne *et al.*, 2010). Além disso, testamos se existe influência do período do dia nessa preferência e na tomada de decisão. Incluímos essa investigação, pois o grau de atenção pode ser modulado pela hora do dia em ratos (Hajós *et al.*, 2008) e o ritmo diário dos peixes pode sofrer oscilações (Volpato & Trajano, 2006), portanto podendo ter efeito na preferência e tomada de decisão.

## **2. Material e Métodos**

### *2.1. Delineamento*

Avaliamos a preferência da tilápia-do-Nilo por diferentes intensidades luminosas na cor ambiental amarela. Os peixes foram isolados por 24 h em aquários com cinco compartimentos de diferentes intensidades luminosas em dois experimentos independentes (Figura 9). Como sugerido por Volpato *et al.* (2007) em testes de preferência, o animal deve escolher livremente entre as opções oferecidas, assim, um corredor permitia ao peixe escolher uma intensidade de luz (Figura 9). Três peixes foram testados isoladamente uma única vez em um dos cinco aquários de vidro transparente de cada experimento. Obtivemos 14 réplicas em cada experimento, pois uma réplica de cada um foi descartada devido a problemas metodológicos. A preferência foi avaliada na manhã (9:00 h às 11:00 h) e à tarde

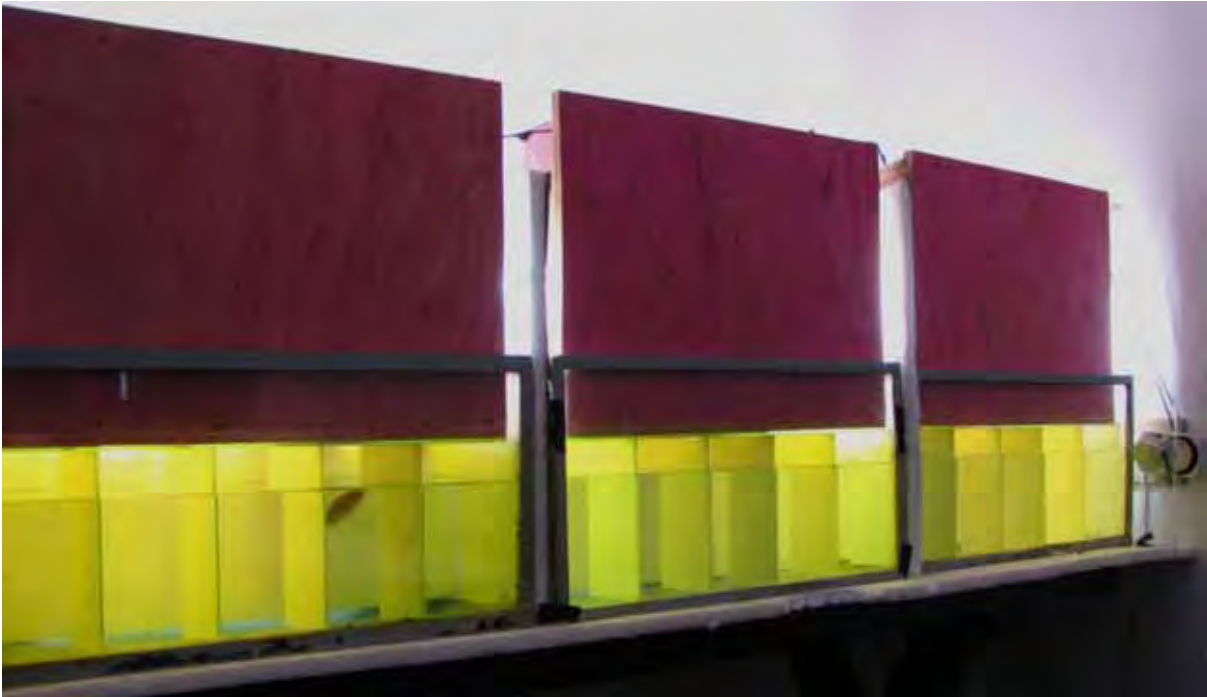
(15:00 h às 17:00 h) a cada 5 min por 4 dias consecutivos, para inferência do possível efeito do período e por razões de consistência.



**Figura 9:** Esquema (em vista superior) do aquário utilizado para avaliar a preferência por intensidade luminosa na coloração ambiental amarela nos dois experimentos. Diferentes intensidades luminosas foram dispostas em cada compartimento (e na extensão do mesmo no corredor) e dispostas aleatoriamente para cada peixe.

## 2.2. Procedimentos específicos

Colocamos lâmpadas brancas de diferentes potências e as ajustamos em alturas ligeiramente diferentes acima de cada compartimento e na parte do corredor de acesso do mesmo, restritas lateralmente por divisórias de madeira que impediam a passagem de luz lateral (Figura 10). Utilizamos uma única camada de celofane amarelo em frente a cada compartimento e lâmina(s) de plástico PVC amarelo acima dos compartimentos e em parte do corredor de acesso a esses. Dessa maneira, obtivemos diferentes intensidades luminosas de amarelo em cada compartimento, mas com o mesmo número de camadas de celofane em frente a eles, evitando um viés de preferência por um compartimento onde o peixe fosse “menos visto”.



**Figura 10:** Foto dos aquários utilizados para avaliar a preferência por intensidade luminosa na cor amarela.

Realizamos dois experimentos consecutivos que diferiam na intensidade luminosa disponível dos compartimentos. No primeiro experimento, as lâmpadas foram de 10, 15, 20, 25, 30 watts e proporcionaram compartimentos de intensidade de luz de  $189 \pm 24$  lux,  $307 \pm 16$  lux,  $442 \pm 17$  lux,  $612 \pm 22$  lux,  $689 \pm 18$  lux, respectivamente e significativamente diferentes entre si (ANOVA e Tukey:  $F_{4,20} = 573,70$  e  $P < 0,001$  em todas comparações). No segundo experimento, as lâmpadas tinham potência de 5, 10, 15, 20, 25 watts e a intensidade luminosa dos compartimentos também foi significativamente diferente entre os mesmos (ANOVA e Tukey:  $F_{4,20} = 1478,86$  e  $P < 0,001$  em todas comparações) e tinham intensidades de  $61 \pm 3$  lux,  $81 \pm 2$  lux,  $124 \pm 2$  lux,  $165 \pm 5$  lux,  $197 \pm 4$  lux. A disposição das intensidades luminosas em cada aquário foi aleatória, evitando um viés de escolha (Volpato *et al.*, 2007).

Oferecemos o alimento diariamente logo após o término das observações de cada dia (17:00 h). A aeração contínua foi oferecida no corredor em frente ao compartimento central. Vinte minutos antes e durante o registro de dados a aeração foi retirada. O comprimento padrão médio ( $\pm$  d.p.m.) dos peixes foi de  $6,8 \pm 0,6$  cm no experimento de intensidade de luz de 189 a 689 lux e foi de  $6,6 \pm 0,7$  cm para o de intensidade de 61 a 197 lux e não diferiu entre os experimentos (Teste *t* de Student independente:  $t_{26} = 1,03$  e  $P = 0,31$ ). A temperatura foi mensurada no corredor em frente ao compartimento central do aquário

central às 13:00 h de cada dia de experimento nas três repetições de cada experimento. A temperatura média ( $\pm$  d.p.m.) foi de  $24,7 \pm 1,2^{\circ}\text{C}$  para o experimento de 189 a 689 lux de intensidade luminosa e de  $23,9 \pm 1,3^{\circ}\text{C}$  para o experimento de 61 a 197 lux de intensidade luminosa, também não diferindo entre os experimentos (Teste  $t$  de Student independente:  $t_{22} = 1,44$  e  $P = 0,16$ ).

### *2.3. Registro e análise de dados*

Nos dois experimentos, registramos a posição dos peixes de acordo com o compartimento em que se encontrava o olho do animal mais facilmente visualizado. Caso o animal estivesse no corredor, anotávamos em frente de qual compartimento situava-se, uma vez que, a intensidade luminosa do corredor era praticamente a mesma do compartimento.

Em cada experimento, observamos a posição de cada peixe por 25 vezes em cada período e dia, totalizando 350 marcações dos 14 peixes. Comparamos as proporções das frequências de visita entre os compartimentos em cada período (dentro da multinomial período) pelo Teste de Goodman (1965). Além disso, também comparamos as proporções das frequências entre manhã e tarde (entre multinomiais) pelo Teste de Goodman (1964).

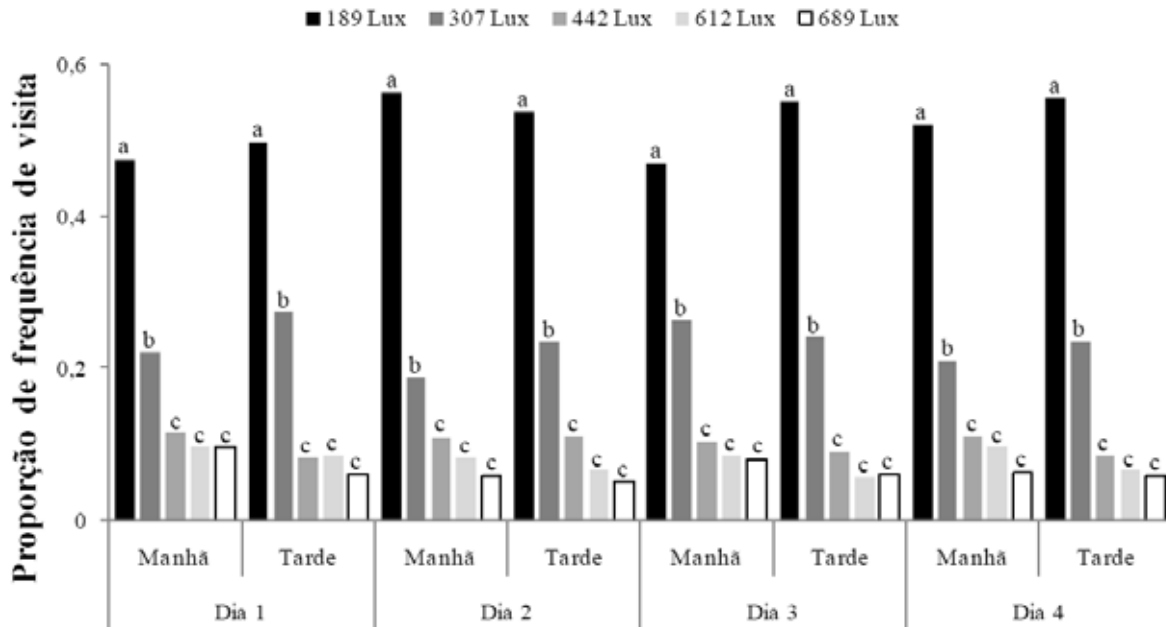
Para os dias de cada período que apresentaram mesmo padrão geral de escolha, somamos as frequências de opções dos peixes e comparamos as proporções da mesma maneira que a descrita anteriormente.

Quando um peixe escolheu significativamente uma intensidade de luz em detrimento das outras, foi definido como "peixe decidido", caso contrário, o peixe foi considerado como "indeciso". Para essa avaliação, somamos a frequência de escolha dos quatro dias em cada período e comparamos entre as intensidades luminosas pelo Teste de Goodman (1965). Posteriormente, comparamos as proporções do número de peixes decididos e indecisos em cada período pelo Teste de Goodman (1965) e também entre os experimentos em cada período pelo Teste de Goodman (1964). Todas as análises estatísticas consideram  $\alpha = 0.05$ .

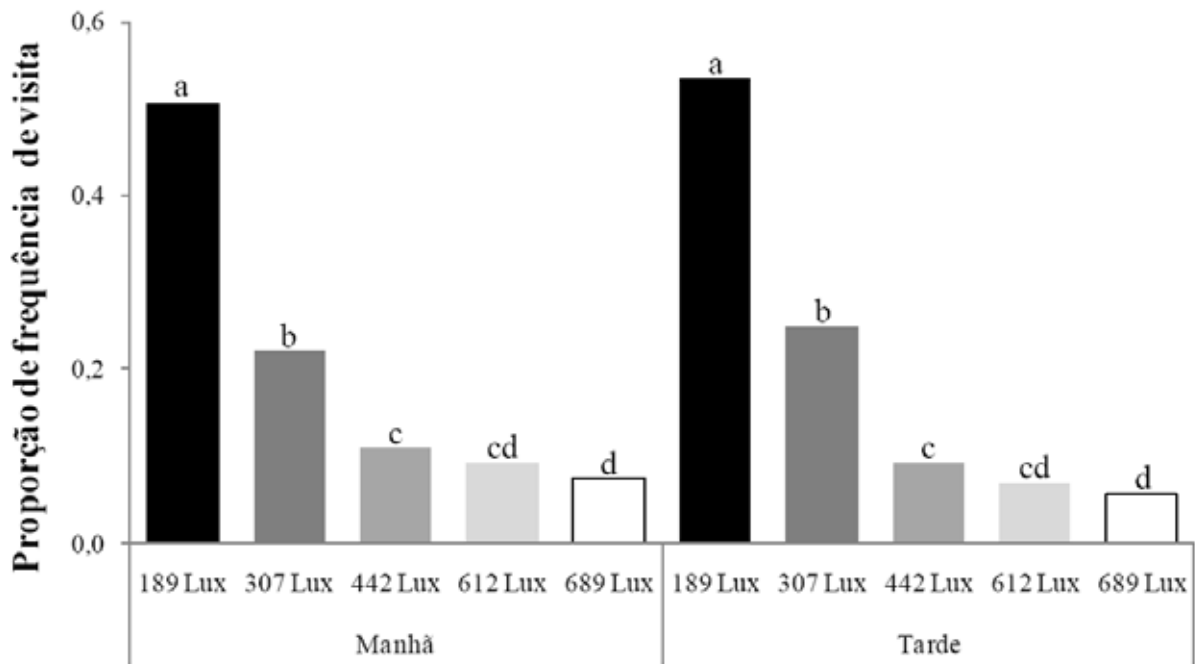
## **3. Resultados**

No primeiro experimento (189 a 689 lux) existiu uma preferência nítida, constante e independente do dia e período observado para a intensidade de luz mais baixa disponível de

189 lux (Figura 11). Somando-se a frequência dos quatro dias (Figura 12), evidenciamos que o padrão de visitação é igual entre os períodos e a relação é inversamente proporcional entre a visitação e a intensidade luminosa.



**Figura 11.** Proporção de escolha por intensidade luminosa amarela ( $N = 14$ ) por dia e período observado. Letras diferentes acima das colunas indicam diferença significativa (Teste de Goodman, 1965; Intervalo de Confiança não inclui o valor zero para  $A_{\text{crítico}} = 9,76$ ) num mesmo dia e período. Não existiu diferença significativa entre os períodos de cada dia para qualquer intensidade luminosa (Teste de Goodman, 1964;  $G_{\text{calculado}} > G_{\text{crítico}} = 2,57$ ).



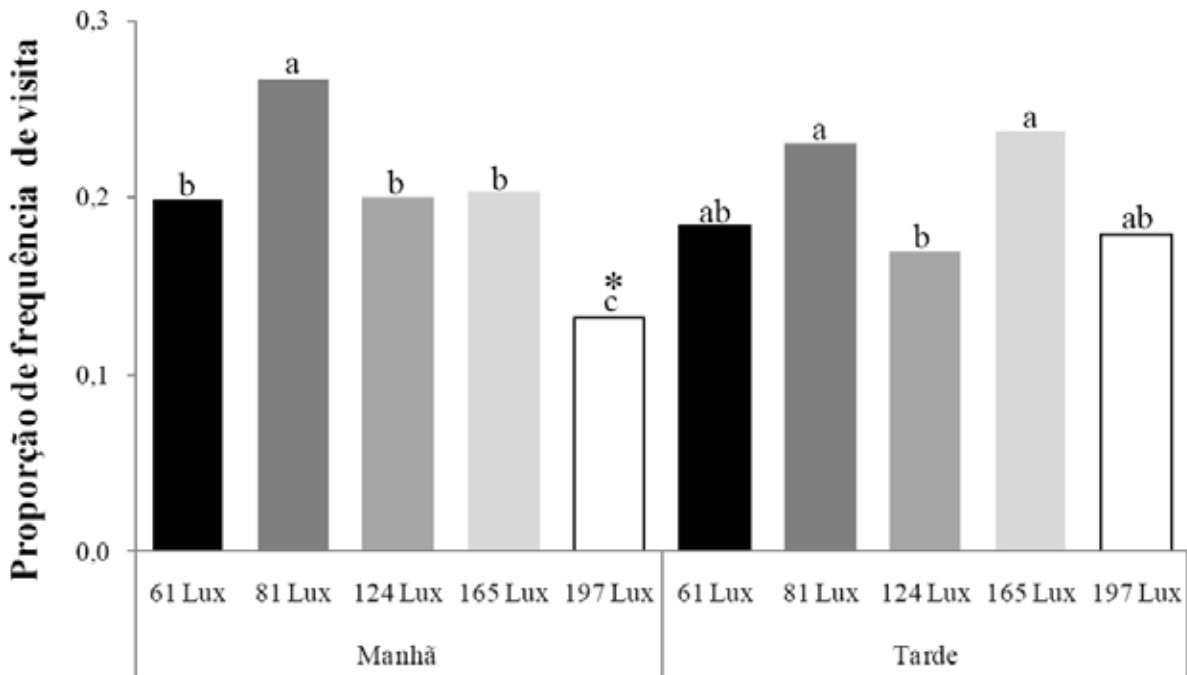
**Figura 12.** Proporção de escolha por intensidade luminosa amarela ( $N = 14$ ). Dados cumulativos de quatro dias para cada período. Letras diferentes acima das colunas indicam diferença num mesmo período (Teste de Goodman, 1965; Intervalo de Confiança não inclui o valor zero para  $A_{\text{crítico}} = 9,76$ ). Não existiu diferença significativa entre os períodos para qualquer intensidade luminosa (Teste de Goodman, 1964;  $G_{\text{calculado}} > G_{\text{crítico}} = 2,57$ ).

No segundo experimento (61 a 197 lux) as relações de preferência existem para o primeiro dia, porém são pouco evidentes nos demais dias (Figura 13). Com relação aos períodos, a preferência é praticamente idêntica entre manhã e tarde para o segundo e terceiro dia, porém verificamos diferenças no primeiro e quarto dia. Na tarde do dia 1 a visitação diminuiu para a intensidade de luz de 81 lux, mas aumentou para a intensidade de 124 lux (Figura 13). Depois, somente no dia 4 houve um aumento de visitação pela intensidade de 197 lux no período da tarde (Figura 13).



**Figura 13.** Proporção de escolha por intensidade luminosa amarela ( $N = 14$ ) por dia e período observado. Letras diferentes acima das colunas indicam diferença significativa (Teste de Goodman, 1965; Intervalo de Confiança não inclui o valor zero para  $A_{\text{crítico}} = 9,76$ ) num mesmo dia e período. Asterisco (\*) indica maior proporção para a mesma intensidade em relação ao outro período do dia (Teste de Goodman, 1964;  $G_{\text{calculado}} > G_{\text{crítico}} = 2,57$ ).

A análise dos dias 2, 3 e 4 somados revelou uma preferência para a intensidade de luz intermediária de 81 lux em detrimento das outras e o compartimento de 197 lux foi o menos visitado no período da manhã (Figura 14). Porém, no período da tarde, não existiu uma preferência específica para uma determinada intensidade de luz testada, sendo que a maior visitação foi nos compartimentos de 81 e 165 lux (Figura 14). A análise dessa Figura 14 também revelou que no período da tarde aumentou a visitação na intensidade de 197 lux.



**Figura 14.** Proporção de escolha por intensidade luminosa amarela ( $N = 14$ ). Dados cumulativos de quatro dias para cada período. Letras diferentes acima das colunas indicam diferença num mesmo período (Teste de Goodman, 1965; Intervalo de Confiança não inclui o valor zero para  $A_{\text{crítico}} = 9,76$ ). Asterisco (\*) indica diferença na intensidade de 197 lux entre manhã e tarde (Teste de Goodman, 1964;  $G_{\text{calculado}} > G_{\text{crítico}} = 2,64$ ).

O perfil de tomada de decisão entre os peixes decididos e indecisos foi o mesmo entre manhã e tarde no experimento de faixa de luz entre 189 e 689 lux, mas o número de peixes indecisos no período da tarde foi maior quando a faixa de luz era entre 61 e 197 lux (Tabela 4). Essa Tabela 4 ainda mostra que o número de peixes decididos diminuiu e o número de peixes indecisos aumentou no segundo experimento em comparação com o primeiro.

**Tabela 4:** Perfil de tomada de decisão de acordo com o período do dia nos dois experimentos de intensidade de luz amarela.

Período	Perfil de tomada de decisão <sup>1</sup>					
	189 a 689 lux			61 a 197 lux		
	Decidido	Indeciso	Total	Decidido	Indeciso	Total
Manhã	8	6	14	6	8	14
Tarde	8 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	14	3 <sup>b</sup>	11 <sup>b*</sup>	14

<sup>1</sup>Peixes decididos escolhem somente uma intensidade luminosa e peixes indecisos mais do que uma. \* indica diferença entre os perfis de tomada de decisão (Teste de Goodman, 1965; Intervalo de Confiança não inclui o valor zero para  $A = 3,84$ ). Letras diferentes indicam diferença em cada perfil entre os experimentos (Teste de Goodman, 1964;  $G_{\text{calculado}} > G_{\text{crítico}} = 1,96$ ).

#### 4. Discussão

A tilápia-do-Nilo prefere visitar constantemente intensidades de luz abaixo de 200 lux, independente do período e dia analisado. Em intensidade de luz abaixo de 200 lux, existe uma preferência no primeiro dia (81 lux pela manhã e 124 lux à tarde), mas não é mais evidente nos demais dias 2, 3 e 4 quando analisados separadamente. Entretanto, quando esses dias (2 ao 4) são analisados em conjunto, a tilápia mostra uma preferência pela intensidade de luz de 81 lux pela manhã, mas no período da tarde não existe uma preferência nítida abaixo de 200 lux. Observamos um alto número de peixes indecisos no período da tarde, mas somente quando a intensidade de luz é adequada ( $< 200$  lux, segundo experimento). Esses dois fatos (ausência de preferência e menor número de peixes decididos) podem ser explicados, provavelmente, pela maior atividade do peixe nesse período, não decidindo e nem preferindo uma única condição.

Embora, no presente estudo, a tilápia tenha visitado muito pouco altas intensidades de luz ( $< 440$  lux) de maneira constante e independente do período (Figura 11), a desova dessa espécie é mais substancial e sincrônica em 2500 lux do que em 500 lux (Ridha & Cruz, 2000). Altas intensidades luminosas promovem um desenvolvimento gonadal mais acelerado e homogêneo. Isso faz sentido, pois Sumpter (1990, *apud* Ridha & Cruz, 2000) relata que baixas intensidades de luz estimulam secreção de melatonina pela glândula pineal que desempenha papel antigonadotrófico em peixes. Porém, independentemente, altas intensidades de luz devem ser utilizadas com certa parcimônia, pois a tilápia-do-Nilo não as prefere.

Larva de *Perca fluviatilis* cresce mais na maior intensidade de luz disponível, porém a melhor taxa de sobrevivência é na menor intensidade de luz testada (Tamazouzt *et al.*, 2000), o que poderia indicar uma melhor condição de bem-estar. Entretanto, larvas de *Gadus morhua* crescem e sobrevivem mais em altas intensidades luminosas (2400 lux) e fotoperíodo contínuo (Puvanendran & Brown, 2002). Além disso, outra complexidade na relação entre intensidade de luz e crescimento é que nem sempre altas intensidades de luz geram um maior crescimento. Existem espécies de peixes que crescem mais em menor intensidade de luz (*e.g.* *Hippoglossus hippoglossus*, Hole & Pittman, 1995 *apud* Trippel & Neil, 2003; *Melanogrammus aeglefinus*, Trippel & Neil, 2003; *Hippocampus erectus*, Lin *et al.*, 2009). Dessa maneira, tal fenômeno indica ser espécie-específico (Puvanendram & Brown, 2002; Han *et al.*, 2005) e que essa complexa relação merece ser melhor investigada para apontar conclusões mais concretas entre bem-estar e produção.

Independentemente, altas intensidades de luz aumentam as taxas reprodutivas da tilápia-do-Nilo (Ridha & Cruz, 2000), porém comprometem o bem-estar da espécie (presente estudo). Portanto é necessário investigar o efeito da intensidade de luz na sobrevivência e crescimento dessa espécie para, então, inferir se bem-estar e produção (pelo menos nesses aspectos produtivos) caminham num mesmo sentido em relação a essa variável. Essa associação entre bem-estar e produção é realmente carente no âmbito dos peixes. Por exemplo, estudos costumam analisar os efeitos de determinada intensidade de luz na produção (*e.g.* Ridha & Cruz, 2000; Han *et al.*, 2005; Strand *et al.*, 2007), mas esquecem de focar se o peixe está em bem-estar nessas condições. Além disso, mesmo testando um amplo espectro de intensidade de luz, não existe efeito no crescimento para *Gadus morhua* de 300 a 1200 lux (Puvanendram & Brown, 2002) e para *Centropristis striata* de 100 a 500 lux (Copeland & Watanabe, 2006), mas não quer dizer que não exista uma intensidade de luz preferencial. Correlacionar deliberadamente aspectos fisiológicos para uma real avaliação do estado de bem-estar de uma espécie não é totalmente válido por si só (vide revisões de Huntingford *et al.*, 2006; Volpato *et al.*, 2007).

No primeiro experimento mostramos existir uma preferência pela menor intensidade de luz disponível (189 lux), revelando a necessidade de um novo experimento para avaliar se a preferência seria por uma intensidade ainda mais baixa, o que de fato aconteceu (81 lux pela manhã). São comuns estudos que avaliam preferências em peixes utilizando-se de poucas opções de escolha (*e.g.* Serra *et al.*, 1999; Webster & Hart, 2004; Mendonça *et al.*, 2010), mas a inferência sobre preferência deve ser ponderada. Estudos com poucas opções

de escolha apenas revelam a “melhor” opção dentre as disponíveis e, não necessariamente, aquela que o peixe realmente prefere, portanto, um amplo espectro de opções deve ser empregado (Volpato, 2007, 2009). Variáveis contínuas, como intensidade de luz, temperatura, profundidade e qualidade da água são perfeitamente exequíveis de serem testadas levando isso em consideração (Volpato, 2007). Para esse tipo de variável, a preferência deve estar centrada em um intermédio de extremos, como avaliamos no presente estudo. Além disso, para não se tratar de escolha casual, a preferência deve ser consistente ao longo do tempo (Volpato, 2009; Browne *et al.*, 2010), o que também obtivemos neste estudo.

Uma hipótese plausível, que revelamos neste estudo, também deve ser melhor investigada e pode ser levada em consideração em estudos de preferência. Se as condições testadas de uma variável contínua (intensidade de luz, no caso) são bem diferentes entre si (primeiro experimento), as escolhas podem ser constantes e independentes de dia e período em favorecimento da mais razoável. Isso poderia levar a conclusão antecipada de que é uma resposta independente do ritmo biológico da espécie. Entretanto, quando os intervalos entre as condições não são abruptos (20 a 30 lux no segundo experimento), existe escolha definida quando o período de aclimação ainda não foi suficiente (primeiro dia analisado). Mas, após mais tempo de aclimação (segundo ao quarto dia), o animal explora as outras opções (no caso de espécies com certa atividade diária), uma vez que as condições não são tão diferentes entre si.

Além disso, outros dois resultados também são intrigantes e corroboram a especulação do parágrafo anterior. Por que não existiu uma preferência nítida por uma intensidade de luz e por que houve um alto número de peixes indecisos à tarde? A explicação mais plausível para esses resultados deve estar centrada na hipótese de que o padrão de atividade da espécie seja mais expressivo à tarde. Embora os autores não tenham discutido essa questão, a análise das Figuras 2b (12L:12D) de Biswas & Takeuchi (2002), 5b de Biswas *et al.* (2002) e 2a de Fortes-Silva *et al.* (2010), pode sugerir tal possibilidade. Essa expressividade também pode estar ligada ao fato da espécie naturalmente alimentar-se à noite (Fortes-Silva *et al.*, 2010), estimulando um aumento de atividade no período antecedente. Assim, pelo fato do segundo experimento não ter nenhuma intensidade de luz aversiva, a tilápia explora de maneira considerável os outros compartimentos nesse período, diminuindo as chances de encontrá-la na intensidade de luz preferencial (ausência de preferência nítida) por não optar (alto número de indecisos) por nenhum compartimento. Isso

pode fazer sentido para o segundo experimento e não para o primeiro, pois, situações estressantes afetam a tomada de decisão em ratos (Dias-Ferreira *et al.*, 2009) e podem também afetar em peixes (presente estudo). Portanto, sugerimos que quando existe somente uma condição satisfatória (experimento 1) não parece existir efeito do período na tomada de decisão por intensidade luminosa, entretanto quando não existe intensidade de luz aversiva (experimento 2) o número de peixes indecisos é maior à tarde, provavelmente pela maior exploração do ambiente nesse período.

De qualquer maneira, a existência de horário preferencial para tomada de decisão e/ou para explorar o ambiente pode ser importante no âmbito da aquicultura e do bem-estar animal e merece ser melhor investigado. No caso específico da tilápia-do-Nilo, salientamos que a preferência por intensidades luminosas varia entre 200 e 60 lux. Como os peixes podem alterar sua distribuição em termos de profundidade para intensidades de luz preferidas (Job & Bellwood, 2000), é interessante que condições como essas sejam providenciadas para essa espécie. Assim sugerimos uma luz incidente de 200 lux nos tanques, a qual o peixe pode adequar sua profundidade para uma intensidade de luz preferida, podendo explorá-lo totalmente sem comprometer seu bem-estar no período mais ativo.

## CAPÍTULO 4:

### *Escolha de recurso e motivação para obtê-lo: uma abordagem comparativa na avaliação do bem-estar em peixes*

#### **Resumo**

O estudo sobre o custo motivacional para alcançar determinado objetivo é importante para avaliar o bem-estar. Em peixes, somente recentemente foi publicado artigo com esse enfoque. Portanto, um dos nossos objetivos foi expandir esse conhecimento nesse grupo avaliando a motivação para obter recursos preferenciais. No primeiro experimento, avaliamos o esforço da tilápia-do-Nilo para alcançar os recursos toca, sedimento e cor ambiental amarela. Quantificamos a motivação por meio da intensidade de toques na porta de acesso ao mesmo, bem como a latência para o primeiro toque, em dois momentos: 48 h e 96 h após estarem no aquário. Comparamos tal esforço com a frequência de escolha por esses recursos antecedente ao teste de esforço (24 h e 72 h, respectivamente). Existiu maior esforço para alcançar um recurso do que nenhum, sendo o sedimento o mais relevante, corroborado por ter sido o único a ser escolhido em detrimento do lado sem recurso. Nosso outro objetivo foi comparar esse resultado do esforço com a escolha da tilápia quando tais recursos fossem apresentados concomitantemente. Assim, desenvolvemos outro experimento independente e a tilápia escolheu um recinto com toca ao invés do recinto com sedimento ou cor ambiental amarela. Portanto, o emprego dessas duas metodologias (escolha e esforço) deve ser levado em consideração para avaliar itens de enriquecimento visando melhorias nas condições de bem-estar.

## 1. Introdução

A identificação de estados internos de bem-estar é um desafio que ainda perdura na ciência. A avaliação do bem-estar não deve ser realizada por um único teste e, ainda, deve ser evitada a avaliação somente pelo enfoque produtivo (vide revisões de Huntingford *et al.*, 2006; Volpato *et al.*, 2007). Além disso, como o estado interno de bem-estar é pouco provável de ser identificado somente por indicadores fisiológicos (Huntingford *et al.*, 2006; Volpato *et al.*, 2007; Volpato, 2009), a avaliação das preferências dos animais tem ganhado relevância para inferir condições de bem-estar nos animais (Duncan 2006; Volpato *et al.*, 2007).

O uso de testes de preferência no contexto do bem-estar animal assume que os animais preferem condições que lhes causem conforto (favoráveis a boas condições de bem-estar). Porém, é também intuitivo pensarmos que o nível de interesse do animal pelo recurso seja proporcional a esse suposto conforto. Se for assim, a medida desse grau de interesse seria fundamental para melhor entendermos o papel de certos fatores nas condições de bem-estar dos animais. Dentro desse raciocínio, alguns autores sugerem medir a força despendida pelos animais para conquistar certo recurso (Hursh *et al.*, 1988; Cooper & Appleby, 1997; Duncan, 2006; Hovland *et al.*, 2006; Jensen & Pedersen, 2008; Asher *et al.*, 2009). Ou seja, não basta conhecer a preferência, mas o quão preferido é.

Nesse contexto, a medida da intensidade da motivação é fonte adicional e importante para se definir a escolha dos animais nas questões de bem-estar (Hovland *et al.*, 2006; Jensen & Pedersen, 2008; Asher *et al.*, 2009). A motivação de um animal pode ser avaliada a partir do esforço comportamental que o indivíduo emprega frente a algum objetivo que deseja atingir (Jensen & Toates, 1993; Mason *et al.*, 1998, 2001). Por exemplo, mensurar a força que um animal empurra uma porta para alcançar uma recompensa indica o grau de motivação para obtê-la (Duncan, 2006; Mason *et al.*, 1998, 2001).

Hovland *et al.* (2006) mensuraram a motivação da raposa, *Vulpes vulpes*, para obter três recursos biologicamente significantes: alimento, fêmea da mesma espécie em período reprodutivo e macho da mesma espécie. Foi analisada a frequência de insistência com que os animais empurravam o objeto que separava sua gaiola daquela que continha o recurso em questão. A motivação para acessar o alimento foi mais alta que a fêmea no cio, embora não significativa, esses autores argumentam ser o recurso mais valioso. Em outro estudo similar, a água para natação foi o recurso mais valioso para o mamífero mustelídeo *Mustela vison*,

sendo que a privação dela aumentou níveis de cortisol em magnitude igual à da privação de alimento (Mason *et al.*, 2001). Assim, a intensidade motivacional parece adequada para discriminar a importância entre recursos, bem como as consequências da privação deles para o animal.

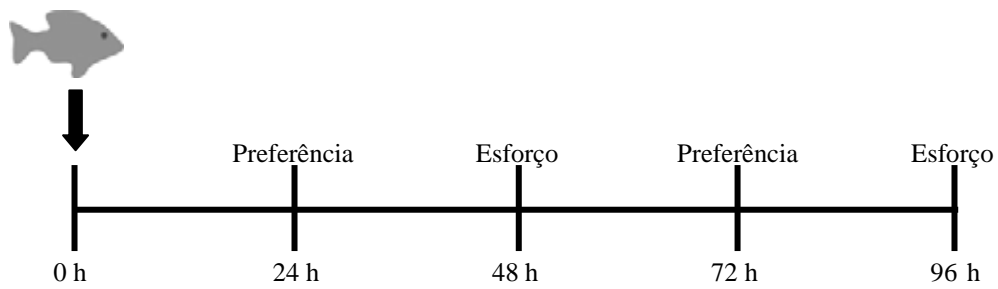
Além dos exemplos descritos acima, a força motivacional para conseguir determinado recurso já foi também investigada em galinha doméstica (Cooper & Appleby, 1997; Albentosa & Cooper, 2005; Kruschwitz *et al.*, 2008), estorninho (Asher *et al.*, 2009), rato (Sherwin, 2004) e porco (Matthews & Ladewig, 1994), entre outros de interesse para a produção animal. Porém, em relação aos peixes, somente agora foi publicado estudo nesse contexto (Galhardo *et al.*, 2011). Assim, procurando melhor consolidar essa metodologia, mensuramos a intensidade de motivação por meio do esforço que a tilápia-do-Nilo faz para conseguir determinado objetivo (no caso, um recurso preferido). E ainda procuramos ordenar os recursos preferidos de acordo com a motivação para obtê-los. Aqui, contamos com uma quantificação de frequência de insistência e velocidade para iniciar as tentativas para obter o recurso (latência). Partimos do pressuposto que quanto maior a frequência e menor a latência nas tentativas de obtenção do recurso, mais relevante é o recurso. Além disso, tais resultados foram comparados com a abordagem de teste de escolha no sentido de complementar (e validar) essa avaliação.

## **2. Material e Métodos**

### *2.1. Experimento 1*

#### 2.1.1. Delineamento

Avaliamos a preferência e o posterior esforço que a tilápia realiza para obter um recurso desejado em duas amostragens (motivos de consistência) como mostra a Figura 15. Investigamos se a tilápia realiza maior esforço para alcançar algum recurso preferencial e se é dependente do recurso analisado (Figura 16).

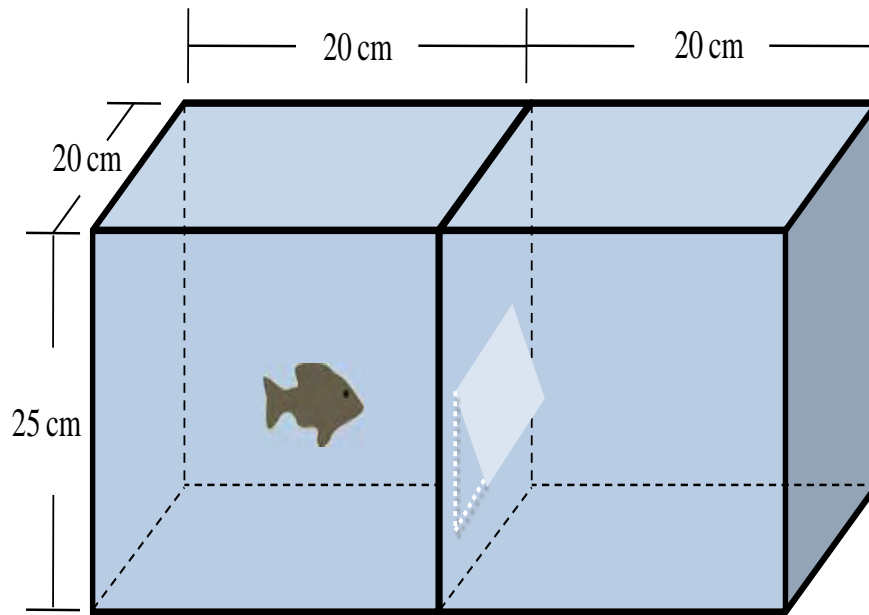


**Figura 15:** Esquema da avaliação ao longo do tempo da preferência e esforço da tilápia-do-Nilo para obter um recurso preferencial desejável. A seta indica o momento em que os animais foram isolados no aquário teste.

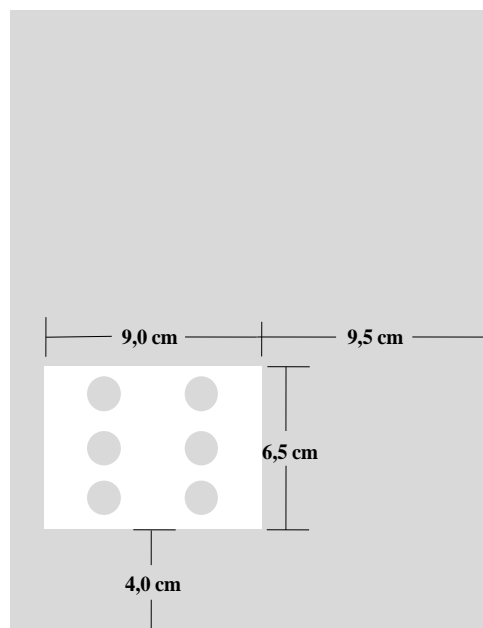


**Figura 16** Grupos experimentais para avaliar o esforço da tilápia-do-Nilo para alcançar um recurso preferencial. Vista frontal do aquário de vidro (detalhes na Figura 17). Três recursos foram isoladamente testados: A: cor ambiental amarela; B: sedimento de rio; C: toca. O animal conhecia todo o recinto e, no momento do teste de esforço, encontrava-se no lado oposto ao do recurso. Interligando as partes do aquário havia uma passagem com porta móvel de acrílico (Figura 18) flexível que era bloqueada para quantificação da insistência (toques nessa porta) do animal ao tentar atingir o outro compartimento.

Metade dos aquários apresentava o recurso do lado direito e a outra, do lado esquerdo, com o intuito de avaliar o possível efeito da lateralidade na preferência e esforço. O grupo controle apresentava-se com os dois recintos vazios e luz branca.



**Figura 17:** Aquário utilizado para avaliar o esforço da tilápia-do-Nilo para alcançar um recurso preferencial desejável. Aquário dividido em 2 recintos de tamanhos iguais por um anteparo branco com uma porta transparente (Figura 18). Num dos recintos foi disponibilizado um recurso e o outro era vazio.



**Figura 18:** Posicionamento da porta (branca) na divisória (cinza) do aquário utilizado para avaliar o esforço. Círculos em cinza indicam aberturas de 1,0 cm de diâmetro.

### 2.1.2. Procedimentos

Individualizamos os peixes no recinto vazio às 10:00 h. Para avaliação da preferência, registramos a posição de cada peixe a cada 2,5 min das 10:00 h às 12:00 h e das 13:00 h às 15:00 h. Utilizamos monitoramento por imagem através de uma câmera sem a presença do observador no laboratório.

Quando o peixe estava no recinto preferencial, realizávamos a translocação para o recinto vazio, através da porta, com um auxílio de um anteparo de PVC. Sugere-se que este procedimento seja menos estressante do que o transporte do animal fora da água (Freitas *et al.*, submetido<sup>4</sup>). Peixes dentro da toca foram gentilmente retirados da mesma com auxílio de uma pequena mangueira de plástico transparente de 1 cm de diâmetro. Logo após a translocação, a porta era bloqueada parcialmente com uma vareta de acrílico de forma que permitia a abertura parcial da porta, mas não a passagem do peixe. Os aquários foram filmados por 15 min aleatoriamente entre 9:00 h e 15:00 h após a translocação do peixe. Registramos o número e a taxa de toque (número de toques/ tempo total – latência) na porta de acesso ao recurso, bem como a latência para o primeiro toque. Esse toque foi definido pelo contato da ponta do focinho (Galhardo *et al.*, 2011), boca ou mordida na porta.

A cor ambiental amarela preferencial (Capítulo 2) foi fornecida através de camadas de celofane amarelo dispostas na parte frontal e metade da superior do aquário. No outro lado desse aquário, para equilibrar a intensidade de luz, utilizamos duas ou três camadas de celofane transparente. Já para o sedimento, preenchemos um dos recintos com o sedimento de rio de granulometria média de  $0,57 \pm 0,07$  cm (Capítulo 1) até 3 cm de altura. A toca (importante recurso para peixes: Gwak, 2003; Delicio *et al.*, 2006; Barcellos *et al.*, 2009; Davey *et al.*, 2009) disponibilizada foi um tubo de PVC branco com 10 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro fixada no fundo do aquário à 5 cm de cada parede (posterior, lateral e anteparo). Cada recinto do aquário apresentava aeração independente na mesma intensidade e posição relativa. Todos os animais foram alimentados ao término da amostragem de cada dia, sendo distribuída na mesma quantidade nos dois recintos e, após 40 min, retirávamos o excesso com auxílio de puçá. O comprimento padrão dos peixes não diferiu entre os grupos testados (ANOVA:  $F_{3,60} = 0,48$ ;  $P = 0,70$ ), sendo de  $6,6 \pm 0,4$  cm para Toca;  $6,6 \pm 0,6$  cm para Amarelo;  $6,7 \pm 0,5$  cm para Sedimento e  $6,5 \pm 0,5$  cm para o grupo controle. A

---

<sup>4</sup> Freitas RHA, Negrão CA, Felício AKC, Volpato GL. Presence and intensity of nonsocial stressors revealed by eye-darkening patterns in Nile tilapia. Zoological Science.

intensidade luminosa incidente nos aquários foi de ~ 120 lux (adequada de acordo com Capítulo 3). A temperatura também não diferiu entre os grupos (Tabela 5).

Na primeira avaliação do esforço (após 48 h de permanência no aquário), os peixes que não tinham visitado os dois recintos (2 para sedimento, 2 para toca e 4 para amarelo) não fizeram parte do estudo.

**Tabela 5:** Temperatura (média ± d.p.m.) dos diferentes grupos na amostragem da preferência e esforço. (N = 16 em cada grupo).

Amostragem	Temperatura (T°C)				Kruskal-Wallis	
	Toca	Amarelo	Sedimento	Controle	$H_{3,60}$	P
Preferência 24 h <sup>1</sup>	23,8 ± 0,6	23,1 ± 1,3	23,9 ± 0,9	23,3 ± 1,9	3,17	0,37
Esforço 48 h	23,3 ± 1,0	22,6 ± 1,7	24,0 ± 1,8	23,1 ± 2,2	4,81	0,19
Preferência 72 h	23,5 ± 0,6	23,4 ± 1,7	23,9 ± 1,6	23,3 ± 1,9	1,15	0,77
Esforço 96 h	23,5 ± 1,0	23,6 ± 1,4	24,4 ± 1,6	23,5 ± 1,7	3,25	0,36

<sup>1</sup>Indica que pelo menos um peixe não tinha visitado o lado do recurso e não entrou na análise da preferência em 24 h somente. Toca (N = 13), Amarelo (N = 15).

### 2.1.3. Análise estatística

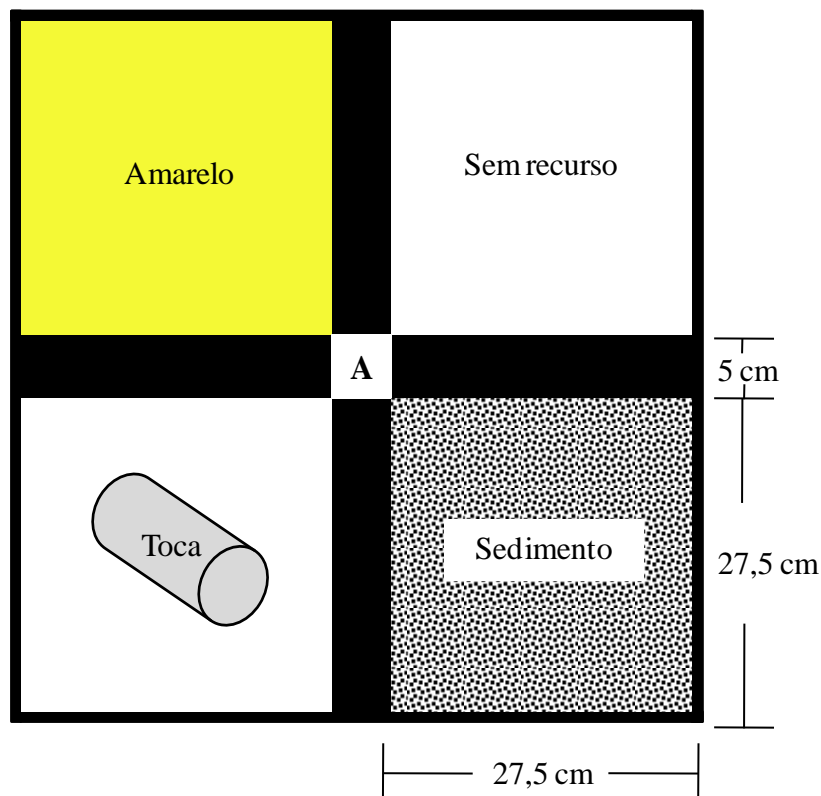
Utilizamos testes paramétricos, onde a homocedasticidade foi verificada pelo Teste de Levene e a normalidade pelo Teste de Kolmogorov-Smirnov. Analisamos a frequência de visita (preferência) em porcentagem por Teste *t* de Student dependente em cada grupo. Para não infringir as premissas paramétricas, todos os dados de esforço (latência, frequência de toque e taxa de toque) foram transformados por  $\sqrt{(x + 0,5)}$ . Utilizamos o Teste *t* de Student independente na comparação do esforço e preferência entre os recursos situados na direita e esquerda para cada grupo separadamente e todos em conjunto. Empregamos a Análise de Variância (ANOVA) de medida repetida com um fator (48/96 h) dentro do efeito principal (grupo) para os dados de frequência e taxa de toque de todos os peixes. Analisamos com ANOVA de uma via os dados de latência de 48 h e 96 h separadamente, devido existir dados dependentes e independentes entre si. Também analisamos os dados totais de esforço somente com os peixes que preferiram o recurso anteriormente ao esforço empregado através de ANOVA de uma via pelo mesmo motivo. Para tanto, selecionamos, anteriormente, os peixes que preferiram o recurso através de uma análise individual pelo Teste de Goodman (1965) dentro da multinomial (Intervalo de Confiança não inclui o valor zero para A = 3,84). Em

todos os casos, empregamos o Pós-teste de LSD. Utilizamos a correlação de Pearson entre dados de preferência e esforço. Consideramos diferença estatística quando  $P < 0,05$ .

## 2.2. Experimento 2

### 2.2.1. Delineamento

A estratégia básica deste experimento (baseada em Mendonça *et al.*, 2010) consistiu em avaliar a preferência pelos mesmos recursos testados no experimento anterior (toca, cor ambiental amarela e sedimento), porém de maneira concomitante para comparação de resultados entre os experimentos. Para tanto, utilizamos um aquário com quatro recintos de igual tamanho, sendo três com um dos recursos e outro sem nenhum recurso (Figura 19).



**Figura 19:** Esquema do aquário utilizado para avaliar a preferência da tilápia-do-Nilo por recursos preferenciais. Aquário dividido em quatro recintos de tamanhos iguais. A letra “A” indica o posicionamento central da aeração.

### 2.2.2. Procedimentos

Testamos 13 peixes individualizados em um dos quatro aquários de vidro ( $60 \times 60 \times 25$  cm de altura, com 20 cm de coluna d'água) após aclimatação durante 24 h. Após esse período, testamos cada peixe uma única vez. Filmamos ( $\sim 1,5$  m acima dos aquários) das 9:50 h às 11:50 h e outro das 12:10 h às 14:10 h, registrando a posição do peixe através do posicionamento dos olhos a cada minuto. Empregamos luz branca ( $\sim 90$  lux) difusa para não comprometer o registro correto do posicionamento do peixe por reflexo. Oferecemos a cor ambiental amarela através uma camada de celofane amarelo acima do recinto e por plástico amarelo abaixo do mesmo na parte externa do aquário. Preenchemos um recinto com o mesmo sedimento do experimento anterior até 3 cm de altura. A toca disponibilizada foi um tubo de PVC branco com 10 cm de comprimento (igual experimento anterior), posicionada de acordo com a Figura 19. As divisórias entre os recintos eram de madeira com 5 cm de largura e 7 cm de altura e fixadas no fundo do aquário. Não oferecemos alimentação durante o período experimental. O comprimento padrão dos peixes foi de  $7,2 \pm 0,7$  cm. A temperatura  $24,6 \pm 0,7$  °C.

### 2.2.3. Análise estatística

Transformamos os dados da frequência de visita por  $\sqrt{x} + 0,5$  para não infringir as premissas de homocedasticidade (Teste de Levene) e normalidade (Teste de Kolmogorov-Smirnov). Utilizamos a ANOVA de medida repetida (dependência) e Pós-teste de LSD. Comparamos a frequência de visita de cada peixe também foi c por Teste de Goodman dentro da multinomial (1965) entre os recintos ( $A = 7,43$ ). Consideramos diferença estatística quando  $P < 0,05$ .

## **3. Resultados**

### *3.1. Experimento 1*

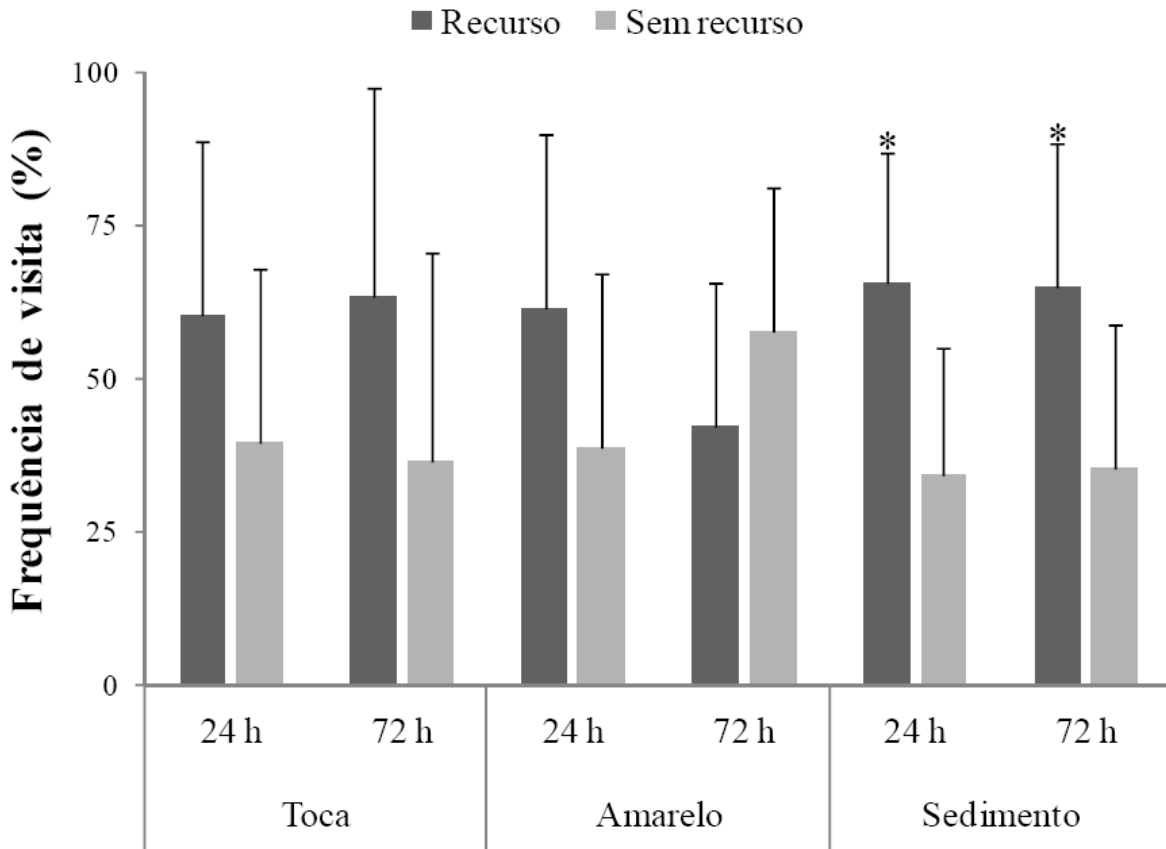
Não existiu efeito da lateralidade na preferência e esforço realizado pelo peixe (Tabela 6).

**Tabela 6:** Comparação da preferência e esforço entre os lados direito ( $N = 8$ ) e esquerdo ( $N = 8$ ) pelo Teste  $t$  de Student independente.

Grupo (Recurso)	Preferência/ Esforço	Latência do 1 <sup>o</sup> toque		Frequência de toque		Taxa de toque		Preferência	
		$t$	$P$	$t$	$P$	$t$	$P$	$T$	$P$
Toca	24 h/48 h	0,31 <sup>8/5</sup>	0,76	0,64	0,53	0,23	0,82	1,33 <sup>6/7</sup>	0,21
	72 h/96 h	1,63 <sup>7/8</sup>	0,13	1,25	0,23	0,36	0,72	0,63	0,54
Amarelo	24 h/48 h	1,32 <sup>7/5</sup>	0,22	0,58	0,57	0,28	0,78	0,20	0,84
	72 h/96 h	0,08 <sup>3/3</sup>	0,94	0,41	0,69	0,09	0,93	0,17	0,87
Sedimento	24 h/48 h	1,28 <sup>7/8</sup>	0,22	1,92	0,08	1,82	0,09	0,66 <sup>7/8</sup>	0,52
	72 h/96 h	0,85 <sup>7/7</sup>	0,41	0,04	0,96	0,17	0,87	0,33	0,75
Controle	24 h/48 h	0,04 <sup>3/6</sup>	0,97	0,48	0,64	0,87	0,40	0,18 <sup>8/6</sup>	0,86
	72 h/96 h	0,73 <sup>3/4</sup>	0,50	0,36	0,73	0,15	0,88	0,46	0,65
Total	24 h/48 h	0,31 <sup>25/24</sup>	0,76	0,50	0,62	1,11	0,27	0,71 <sup>29/29</sup>	0,48
	72 h/96 h	0,90 <sup>20/22</sup>	0,37	0,66	0,51	0,07	0,94	0,66	0,51

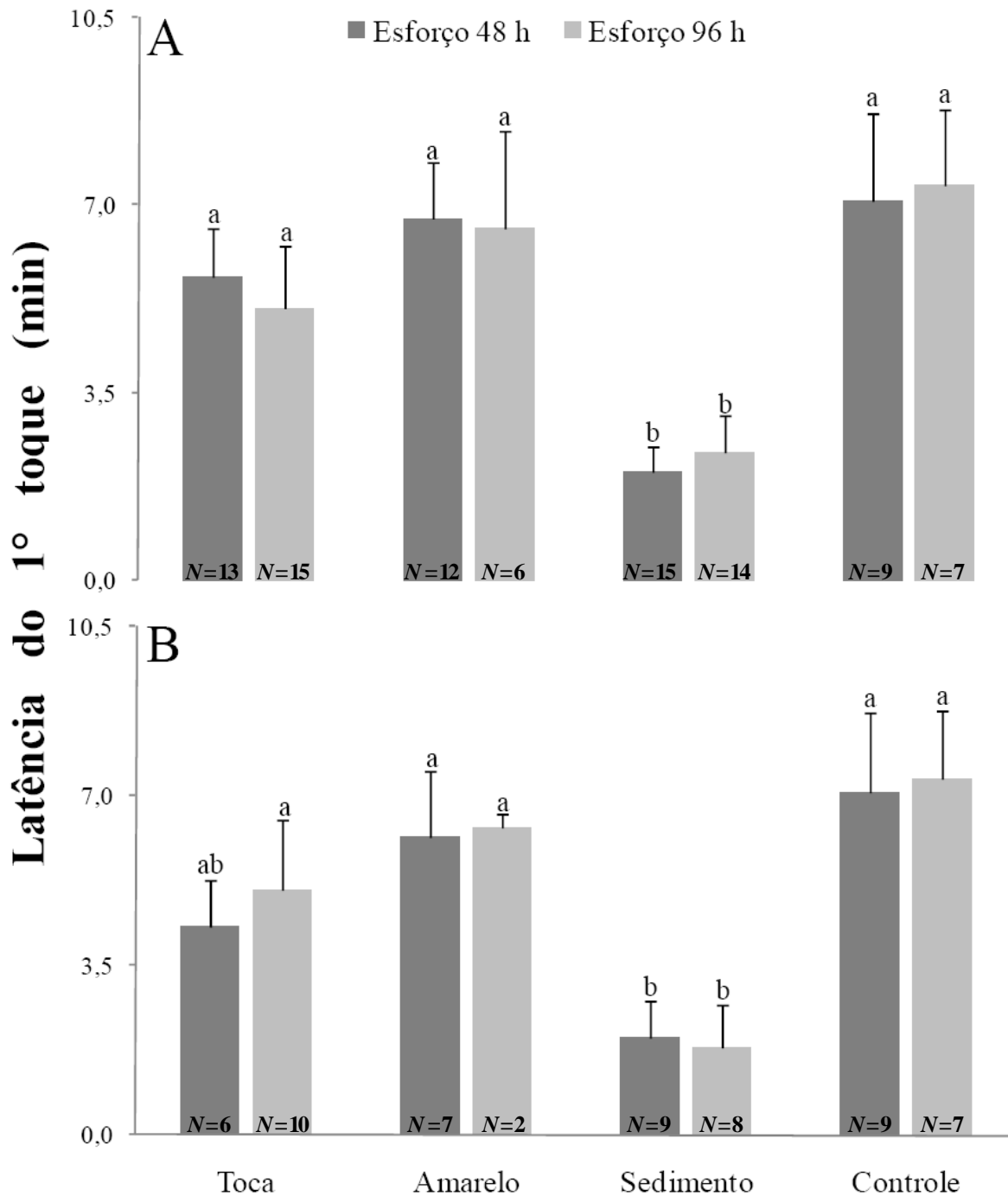
Número sobrescrito indica o valor do  $N$  do lado esquerdo/direito para os casos diferentes de  $N = 8$  em ambos os lados. Nesses, pelo menos um peixe não tocou a porta (latência). Na preferência, pelo menos um peixe não visitou o lado oposto ao inicial.

A tilápia preferiu visitar significativamente somente o sedimento (Figura 20). Porém, mesmo a preferência não sendo significativa, a visitação pelo lado do recurso foi maior que o lado sem recurso para a toca (Figura 20). Existiu perda de interesse pelo amarelo após 96 h (Figura 20), pois a frequência de visita pelo lado amarelo foi menor que o lado sem recurso.



**Figura 20:** Frequência de visita (média  $\pm$  d.p.m.) pelo recurso após 24 h e 72 h. Asterisco (\*) indica diferença entre os lados com e sem recurso em cada amostragem de 24 h ou 72 h. Toca (24 h:  $t_{12} = 1,33$  e  $P = 0,21$ ; 72 h:  $t_{15} = 1,58$  e  $P = 0,13$ ), Amarelo (24 h:  $t_{15} = 1,59$  e  $P = 0,13$ ; 72 h:  $t_{15} = 1,33$  e  $P = 0,20$ ), Sedimento (24 h:  $t_{14} = 2,93$  e  $P < 0,01$ ; 72 h:  $t_{15} = 2,52$  e  $P < 0,05$ ).

Independentemente se os peixes preferiram o recurso antes do esforço (Figura 21A), a latência para o primeiro toque na porta foi menor para o sedimento tanto após 48 h (ANOVA:  $F_{3,45} = 7,16$ ;  $P < 0,001$ ), quanto após 96 h (ANOVA:  $F_{3,38} = 4,53$ ;  $P < 0,01$ ). Para os peixes que preferiram o recurso anteriormente ao esforço (Figura 21B) a resposta também é a mesma, onde a latência é menor para o sedimento em 48 h (ANOVA:  $F_{3,27} = 3,53$ ;  $P < 0,05$ ) e 96 h (ANOVA:  $F_{3,23} = 4,69$ ;  $P < 0,01$ ). Entretanto, para esses peixes após 48 h a latência é igual entre toca e sedimento (Figura 21B; LSD:  $P = 0,11$ ).

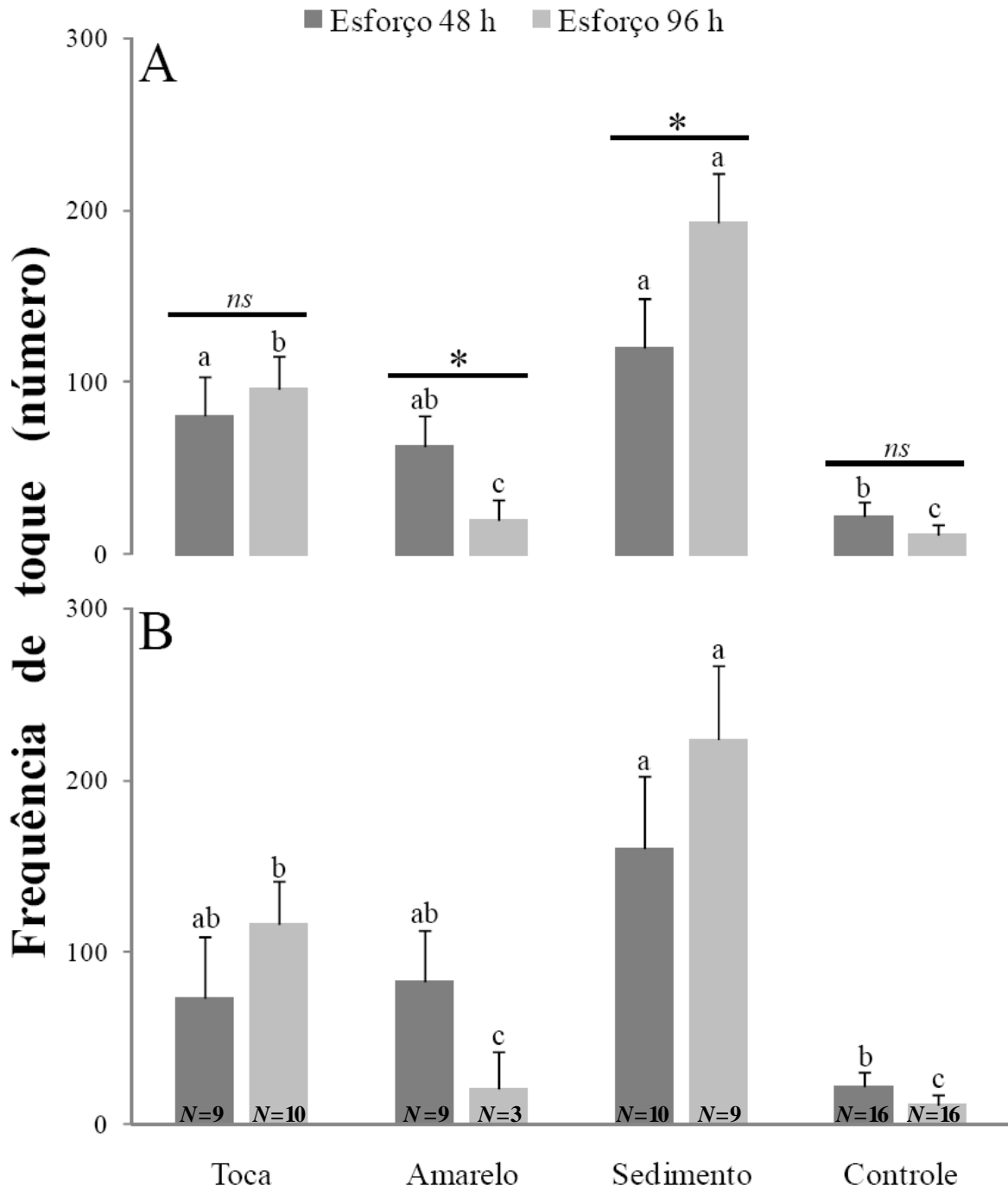


**Figura 21:** Latência (média  $\pm$  erro padrão das médias - e.p.m.) para o primeiro toque na porta de acesso ao recurso após 48 h e 96 h para o total de peixes (A) e para os peixes que preferiram o recurso anteriormente (B). Diferentes letras minúsculas indicam diferença entre os recursos em cada amostragem de 48 h ou 96 h.

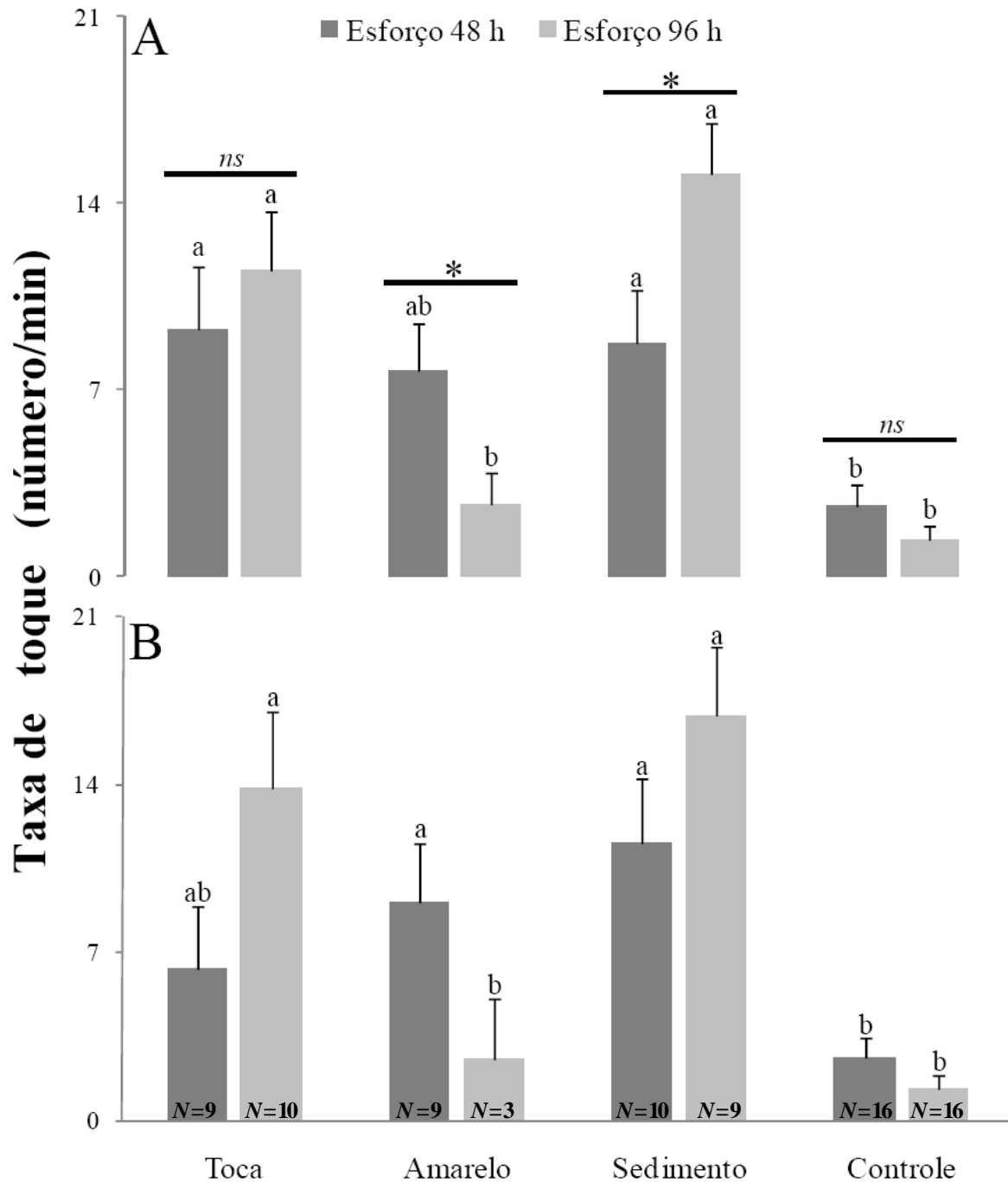
Para todos os peixes analisados, houve efeito da interação entre o tipo de recurso e o tempo da amostragem na frequência de toque na porta (ANOVA:  $F_{3,60} = 5,63$ ;  $P < 0,01$ ). O Pós-teste (LSD) revela que após 48 h essa frequência é maior para toca e sedimento do que o

grupo controle (Figura 22A). Após 96 h essa frequência aumentou para o sedimento, sendo que se sobressaiu dos demais (Figura 22A). Em contraposição, a tilápia diminuiu essa frequência para o amarelo nas 96 h (Figura 22A). Para os peixes que preferiram o recurso, o mesmo padrão nessa frequência de toque foi visto após 96 h (Figura 22B; ANOVA:  $F_{3,34} = 18,24$ ;  $P < 0,001$ ). Para esses peixes após 48 h, somente para sedimento essa frequência foi diferente do grupo controle (Figura 22B; ANOVA:  $F_{3,40} = 5,03$ ;  $P < 0,01$ ).

Para a taxa de toque na porta também houve interação entre o tipo de recurso e tempo de amostragem (ANOVA:  $F_{3,60} = 6,78$ ;  $P < 0,001$ ) para todos os peixes analisados. Tanto após 48 h quanto 96 h, a taxa de toque para toca e sedimento foram maiores que a do grupo controle (Figura 23A). Além disso, essa taxa diminuiu para o amarelo, mas aumentou para o sedimento das 48 h para as 96 h (Figura 23A). A taxa de toque foi maior para sedimento e amarelo que grupo controle após 48 h (Figura 23B; ANOVA:  $F_{3,40} = 3,87$ ;  $P < 0,05$ ) e maior para sedimento e toca após 96 h (Figura 23B; ANOVA:  $F_{3,34} = 18,37$ ;  $P < 0,001$ ), para os peixes que preferiram o recurso anteriormente ao esforço.



**Figura 22:** Frequência de toques (média ± e.p.m.) na porta de acesso ao recurso após 48 h e 96 h para o total de peixes (A,  $N = 16$ ) e para os peixes que preferiram o recurso anteriormente (B). Diferentes letras minúsculas indicam diferença entre os recursos em cada amostragem de 48 h ou 96 h. Barras acima das colunas comparam as amostragens de cada recurso, sendo que *ns* indica que não houve diferença e asterisco (\*) que houve diferença. As amostragens não foram comparadas em B.



**Figura 23:** Taxa de toque (média ± e.p.m.) na porta de acesso ao recurso após 48 h e 96 h para o total de peixes (A,  $N = 16$ ) e para os peixes que preferiram o recurso anteriormente (B). Diferentes letras minúsculas indicam diferença entre os recursos em cada amostragem de 48 h ou 96 h. Barras acima das colunas comparam as amostragens de cada recurso, sendo que *ns* indica que não houve diferença e asterisco (\*) que houve diferença. As amostragens não foram comparadas em B.

Houve correlação entre a preferência e os dados de esforço posterior somente para o sedimento na frequência e taxa de toque da segunda amostragem, tanto para o total de peixes, quanto para aqueles que preferiram o recurso anteriormente ao esforço (Tabela 7). A ausência de correlação também ocorreu igualmente para os dois grupos de peixes.

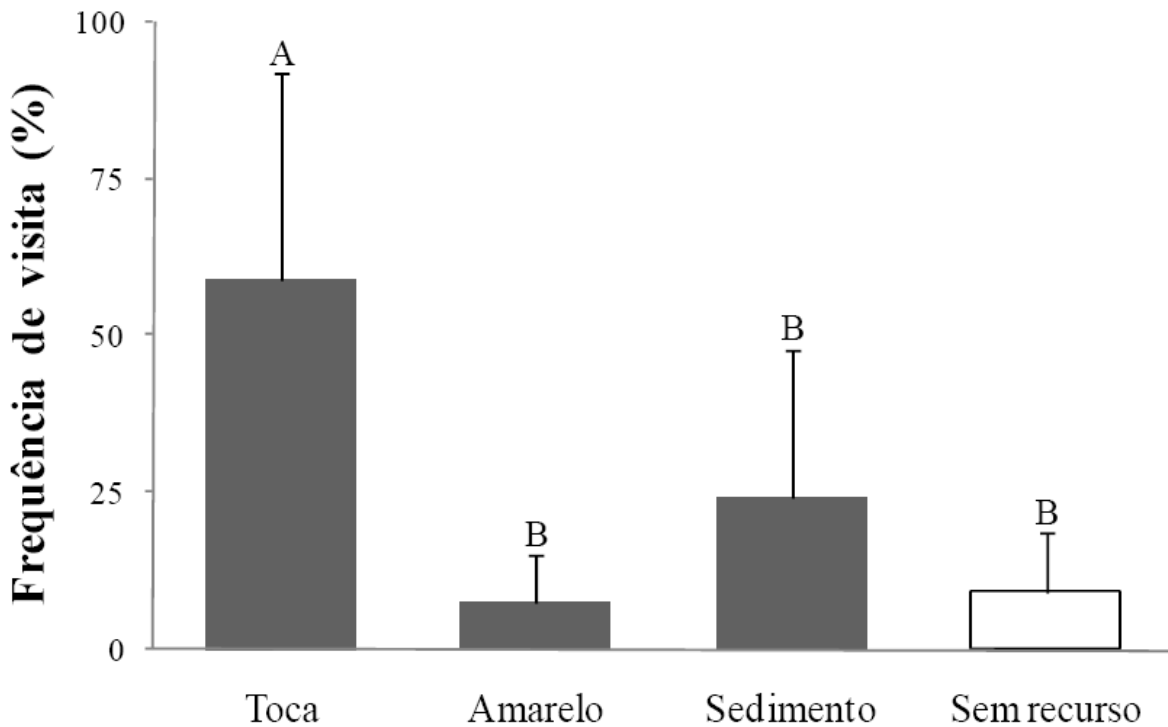
**Tabela 7:** Correlação de Pearson entre a frequência de visita ao recurso (V) e latência (L), frequência (F) e taxa (T) de toque na porta para obter o recurso.

		Total de Peixes			Peixes que preferiram		
		Toca	Amarelo	Sedimento	Toca	Amarelo	Sedimento
V 24 h ×	R <sup>2</sup>	0,18	0,16	0,00	0,08	0,01	0,04
L 48 h	P <sup>N</sup>	0,23 <sup>10</sup>	0,20 <sup>12</sup>	0,94 <sup>14</sup>	0,59 <sup>7</sup>	0,80 <sup>7</sup>	0,63 <sup>9</sup>
V 72 h ×	R <sup>2</sup>	0,03	0,03	0,00	0,01	N = 2	0,04
L 96 h	P <sup>N</sup>	0,51 <sup>15</sup>	0,73 <sup>6</sup>	0,87 <sup>14</sup>	0,83 <sup>10</sup>		0,64 <sup>8</sup>
V 24 h ×	R <sup>2</sup>	0,00	0,03	0,16	0,10	0,07	0,00
F 48 h	P <sup>N</sup>	0,96 <sup>13</sup>	0,56 <sup>16</sup>	0,14 <sup>15</sup>	0,41 <sup>9</sup>	0,50 <sup>9</sup>	0,95 <sup>10</sup>
V 72 h ×	R <sup>2</sup>	0,11	0,10	<b>0,35</b>	0,07	0,16	<b>0,70</b>
F 96 h	P <sup>N</sup>	0,21 <sup>16</sup>	0,24 <sup>16</sup>	<b>&lt; 0,05<sup>16</sup></b>	0,47 <sup>10</sup>	0,73 <sup>3</sup>	<b>&lt; 0,01<sup>9</sup></b>
V 24 h ×	R <sup>2</sup>	0,01	0,01	0,18	0,09	0,10	0,00
T 48 h	P <sup>N</sup>	0,79 <sup>13</sup>	0,76 <sup>16</sup>	0,12 <sup>15</sup>	0,44 <sup>9</sup>	0,40 <sup>9</sup>	0,99 <sup>10</sup>
V 72 h ×	R <sup>2</sup>	0,20	0,12	<b>0,41</b>	0,01	0,13	<b>0,78</b>
T 96 h	P <sup>N</sup>	0,08 <sup>16</sup>	0,18 <sup>16</sup>	<b>&lt; 0,01<sup>16</sup></b>	0,76 <sup>10</sup>	0,77 <sup>3</sup>	<b>&lt; 0,01<sup>9</sup></b>

Em cinza e negrito são destacadas as diferenças significativas.

### 3.2. Experimento 2

Os resultados mostram influência do recurso na frequência de visita da tilápia (ANOVA:  $F_{3,36} = 12,46$ ;  $P < 0,001$ ), sendo o recinto com a toca o mais visitado (Figura 24; LSD:  $P < 0,001$ ). Entretanto, nem todos os peixes escolheram o recinto com a toca. O Teste de Goodman (1965) mostra que 8 peixes escolheram significativamente a toca, 4 o sedimento e 1 peixe não escolheu nenhum recinto.



**Figura 24:** Frequência de visita (média  $\pm$  d.p.m.) nos recintos. Letras diferentes denotam diferença estatística.

#### 4. Discussão

Aqui demonstramos que a tilápia-do-Nilo se esforça para obter um recurso preferencial e o custo desse esforço depende do tipo de recurso. Assim, a metodologia de esforço motivacional pode ser usada não só para avaliar esse estado em peixes (Galhardo *et al.*, 2011), mas também para hierarquizar itens para uso no enriquecimento ambiental dessa espécie. Desses dados, vimos que o sedimento é o recurso motivacional mais importante para a tilápia. Porém, a partir do experimento de escolha, a toca se mostrou como recurso prioritário. Assim, sugerimos que esses dois recursos são importantes para a tilápia-do-Nilo e, o emprego dessas duas metodologias (escolha e esforço) deve ser considerado na avaliação de itens que possam ser usados no enriquecimento visando oferecer ambientes que propiciem condições de bem-estar nessa espécie.

Quando se usa testes de preferência/escolha, vários cuidados devem ser tomados (vide Volpato, 2007, 2009; Volpato *et al.*, 2007). Um dos importantes vieses de análise é saber se o animal não apresenta lateralidade para um dos locais do aparelho de teste (Volpato *et al.*, 2007; Stenett & Strauss, 2010). Isso foi resolvido no presente estudo, uma vez que,

tanto o esforço como a latência foi igual entre os dois lados do aquário para qualquer recurso e sem recurso (Tabela 6).

O nosso presente estudo mostrou que, pelo menos em uma das variáveis analisadas (Figuras 21 a 23), o interesse por qualquer um dos recursos foi maior que o grupo controle, sugerindo que esses três recursos são importantes. Após 96 h no aquário teste, a tilápia diminui a insistência em obter a cor amarela (Figuras 22 e 23), sugerindo que perdeu o interesse por esse recurso e que não deva ser tão importante como a toca e o sedimento. Possivelmente, esse desinteresse esteja relacionado ao comportamento que o enriquecimento ambiental pode proporcionar. Tocas oferecem oportunidade de esconderijo, proteção e intensidade de luz mais baixa. Para a tilápia-do-Nilo, as tocas oferecem proteção contra ataques predatórios (Kolding, 1993) e, mesmo na ausência de predador, esses peixes permaneceram de 75 a 98% do tempo dentro dela (Colombo *et al.*, em preparação<sup>5</sup>). O sedimento oferece possibilidade de construção de ninho (Capítulo 1), que é usado para reprodução (Lowe-McConnell, 1958; Mendonça & Gonçalves-de-Freitas, 2008), e também propicia local de forrageamento onde alimentos podem ficar escondidos entre os grãos de sedimento (Webster & Hart, 2004). Porém, embora a cor ambiental amarela seja a preferida da espécie (Luchiari *et al.*, 2007; Capítulo 2), não oferece características semelhantes as que são oferecidas por toca e sedimento.

De fato, a toca e o sedimento são importantes aos peixes por algumas razões. Estruturas artificiais, que servem como toca, são importantes para reduzir a vulnerabilidade à predação em outros ciclídeos (Santos *et al.*, 2008). A presença de tocas adequadas pode fornecer benefício metabólico para os peixes (Millidine *et al.*, 2006), que pode ser convertido em crescimento (Gwak, 2003), sugerindo que esse recurso seja realmente importante não apenas no contexto da predação. A combinação de tocas com coloração ambiental azul diminui a magnitude e duração do estresse em jundiá, *Rhamdia quelen* (Barcellos *et al.*, 2009). A presença de sedimento aumenta o crescimento, a produção e a sobrevivência em tilápia-do-Nilo (Uddin *et al.*, 2007); é importante para garantir o bem-estar dessa espécie (Galhardo *et al.*, 2008; Mendonça *et al.*, 2010; Capítulo 1) e importante para aspectos reprodutivos em ciclídeos (Takemon & Nakanishi, 1998).

Entre sedimento e toca, no primeiro experimento vemos que o primeiro é mais relevante para a tilápia (Figuras 21 e 22). Além disso, foi o único recurso mais visitado que o

---

<sup>5</sup> Colombo AC, Freitas RHA, Volpato GL. Frustration in Nile tilapia and its effects on aggressiveness.

lado sem enriquecimento (Figura 20), o único que apresentou alguma correlação entre esforço e preferência (Tabela 7) e o único que a tilápia aumentou seu esforço quando testada em 96 h no ambiente em relação ao teste anterior (48 h) (Figuras 22 e 23). Em quatro dias de avaliação em teste de preferência, Delício *et al.* (2006) mostraram que a tilápia-do-Nilo escolhe sedimento somente no primeiro dia, corroborando o fato de uma possível motivação inicial maior para esse recurso.

Em artigo de revisão, Jensen & Pedersen (2008) relatam que quando a situação apresenta vários recursos para estimular um comportamento específico (nesse caso, o toque na porta), parece relevante combinar escolha e custo de acesso ao recurso. Essa foi a estratégia de nosso primeiro experimento; porém, a escolha só foi significativa para o sedimento (Figura 20), mesmo que os outros recursos tenham sido considerados preferenciais. Além disso, só existiu correlação entre o esforço e a preferência para esse recurso e, mesmo assim, somente na segunda amostragem. Portanto, isso reforça que a aplicabilidade do teste de escolha entre duas alternativas não seja muito eficiente para considerações de bem-estar (como ressaltado em Volpato *et al.*, 2007), porém pode ser mais eficientemente considerada quando se impõe um custo para alcançar uma das escolhas já conhecidas como preferenciais. De fato, somente consistência na resposta em testes de escolha com um amplo espectro de opções pode ser considerada como preferência e tornam a avaliação de bem-estar satisfatória (Volpato, 2009; Browne *et al.*, 2010; Capítulos anteriores). A não permanência significativa em um recurso preferencial (testado anteriormente) pode ser explicada pela divisão do aquário em dois recintos que possam ser pequenos para o peixe. A tilápia, mesmo não obtendo um recurso do outro lado da porta, investe certo tempo para explorar esse novo local ausente de recurso. Por ser uma espécie territorial, é possível que isso decorra de sua tentativa de obter maior espaço. Assim, quando a porta está fechada e do outro lado não existe recurso, sua motivação para atravessá-la estaria na exploração do ambiente, uma busca por expansão territorial visto que o aquário é pequeno. De fato, isso é corroborado pelo estudo de Galhardo *et al.* (2011), no qual os peixes após acessarem o recinto com sedimento através de uma porta também retornavam para o recinto sem recurso. No presente estudo, quando na área bloqueada havia um recurso adicional além do espaço físico, sua motivação foi maior para atravessar essa barreira. Além disso, como o padrão de resposta foi praticamente o mesmo entre os peixes que escolheram o recurso anteriormente ao esforço e o total de peixes independente da escolha anterior (vide Figuras 21 a 23 e Tabela 7), reforça, ainda mais, toda essa discussão. Ou seja, escolher mais

uma opção entre duas alternativas não indica, necessariamente, estar mais motivado (se esforçar mais) para obter essa opção escolhida.

Um fato bastante intrigante é que a tilápia-do-Nilo apresentou maior insistência quando o reforço era o sedimento, mas a toca foi a mais visitada no teste de escolha (segundo experimento). Essa incongruência parece sugerir que essas duas metodologias detectem aspectos diferentes da preferência dos animais. Isso implica que devemos ser cautelosos na avaliação dessas preferências. Por outro lado, nos parece mais parcimonioso aceitar que ambas as metodologias devam ser usadas, indicando assim uma gama maior de preferências, mas reduzindo-se a chance de que alguma delas seja preterida pelo método de análise.

O favorecimento de toca, ao invés de sedimento, no segundo experimento é conflitante com o encontrado no primeiro experimento. Conflita também com Delício *et al.* (2006) para essa mesma espécie. Porém, como esses autores usaram apenas machos adultos, as comparações dos estudos ficam limitadas, pois os machos dessa espécie constroem ninhos para reprodução (Lowe-McConnell, 1958; Mendonça & Gonçalves-de-Freitas, 2008) e, provavelmente, influenciando na escolha por sedimento devido à maior motivação para reprodução. Nota-se também que escolha da população foi pela toca, mas nem todos (38%) a escolheram. Estudos de bem-estar animal, freqüentemente, atentam-se por medidas quantitativas gerais e pouca relevância é dada para as diferenças individuais (Fraser, 2009) e isso merece importância na avaliação do bem-estar animal<sup>6</sup>. Assim, embora mais estudos sejam necessários, dentre os fatores investigados no presente estudo fica claro que apenas toca e sedimento foram preferenciais, seja pelas escolhas ou pelo esforço despendido.

---

<sup>6</sup>Tal contexto está presente na dissertação de Caroline Marques Maia (bolsa FAPESP: 2010/02953-7) intitulada: "Diferenciação entre escolha e preferência em peixes: uma abordagem para o bem-estar", em desenvolvimento em nossos laboratórios.

## **CAPÍTULO 5:**

### *Presença de sedimento é tão importante quanto alimento para a tilápia-do-Nilo*

#### **Resumo**

Os testes motivacionais através do esforço para alcançar um recurso são utilizados para inferir a importância dos mesmos no bem-estar do animal. Comumente os recursos são testados sozinhos, mas será que existe efeito aditivo na força motivacional se os recursos forem somados? Essa foi a primeira hipótese (i) que testamos. Também investigamos a hipótese (ii) de que o esforço para alcançar um ou a soma de recurso(s) não alimentar(es), mas preferidos, é menor que a motivação para obter alimento. Além disso, testamos se o jejum de 48 h aumenta a motivação por alimento em comparação ao jejum de 24 h, hipótese (iii). Avaliamos a intensidade de toques e latência da tilápia-do-Nilo para tocar a porta de acesso ao(s) recurso(s): sedimento (S), cor ambiental amarela (C), toca (T), S+C (SC), ST, CT, SCT, alimento (jejum de 24 h e 48 h). O aumento de recursos não gerou aumento claro de motivação, portanto qualidade do enriquecimento prevalece sobre quantidade. Grupos com sedimento (S, SC, ST, SCT) foram iguais em motivação ao alimento e sugerimos que esse recurso seja tão importante quanto alimentar-se de um dia para o outro. O tempo de 48 h de jejum aumenta a insistência da tilápia para obter alimento, mas a latência é independente do tempo de jejum. De maneira prática, oferecer sedimento é importante na melhoria do bem-estar dessa espécie.

## 1. Introdução

Estudos centrados nas preferências dos animais a partir do ponto de vista do animal são defendidos por alguns autores como prioritários para a avaliação do bem-estar (Dawkins, 2006; Volpato *et al.*, 2007). Entretanto, conhecer a força dessa preferência pode somar na precisão da avaliação (Duncan, 2006). E, nesse âmbito, alguns estudos foram realizados para mensurar tal força, chamada motivacional. Métodos clássicos de medir essa força envolvem manipulação do custo de acesso (*e.g.*, peso de porta ou número de vezes para pressionar uma alavanca) que deve ser realizado para obter o recurso e determinar a mudança no gasto (motivação) à medida que o custo aumenta (Kirkden & Pajor, 2006). A premissa básica nesses métodos é que um animal mais motivado “pagará” um maior custo para obter o recurso; ou seja, que o custo está relacionado com a motivação proporcionada pelo recurso (Jensen & Toates, 1993; Mason *et al.*, 1998, 2001; Duncan, 2006; Kirkden & Pajor, 2006).

Entretanto, os artigos acerca desses métodos normalmente testam a motivação para se obter um recurso isoladamente (*e.g.* alimento, espaço adicional, coespecíficos, objetos e etc.) e posteriormente fazem comparações em ordem de importância. Até o momento, nenhum estudo testou empiricamente se o aumento do número de recursos aumentaria o esforço para ganhar acesso, embora isso faça sentido, portanto testamos essa hipótese (i). Desse modo podemos avaliar se a quantidade é mais ou menos importante que a qualidade dos recursos.

A força motivacional tem sido investigada em mamíferos e aves (*e.g.* Matthews & Ladewig, 1994; Mason *et al.*, 2001; Sherwin, 2004; Hovland *et al.*, 2006; Schütz *et al.*, 2006; Asher *et al.*, 2009). Em peixes, encontramos apenas um estudo que foi publicado há poucos meses, onde o objetivo principal foi adaptar essa metodologia para esse grupo (Galhardo *et al.*, 2011). Embora esse trabalho tenha comparado o esforço entre obter alimento e ter contato social, os próprios autores enfatizam que não almejam comparar esses recursos de maneira definitiva. Por outro lado, nós testamos recursos que são importantes e/ou preferenciais para a tilápia-do-Nilo, *O. niloticus*, espécie largamente utilizada em piscicultura e pesquisas científicas. Avaliamos a motivação para obter sedimento de rio (definido no Capítulo 1), cor ambiental amarela (estabelecido no Capítulo 2) e toca (Delício *et al.*, 2006; Colombo *et al.*, em preparação<sup>5</sup>; visto no Capítulo 4). Dada a possibilidade de comparação da intensidade motivacional exibida em relação a diferentes recursos e estímulos, comparamos a importância relativa dos mesmos.

Mason *et al.* (2001) concluem que, para o mustelídeo *Mustela vison*, o acesso a água para natação é tão importante quanto o alimento, pois a privação desses recursos aumenta níveis de cortisol em igual magnitude. Em peixes, *Oreochromis mossambicus*, o contato social é tão relevante quanto o alimento, pois o esforço para acessar esses é praticamente o mesmo (Galhardo *et al.*, 2011). Em coelhos esse contato social é quase tão importante quanto o alimento, pois o valor foi igual na maioria das variáveis medidas, diferindo apenas em uma (Seaman *et al.*, 2008). Entretanto, o mais comum é que o alimento seja prioritário em relação a outros recursos (*e.g.* Matthews & Ladewig, 1994; Warburton & Mason, 2003; Hovland *et al.*, 2006). Dessa maneira, também avaliamos a hipótese (ii) de que o esforço para obter alimento (recurso de sobrevivência básica) é maior que para obter um ou a soma de outros recursos (sedimento, cor ambiental amarela e toca) que, necessariamente, não comprometam sua sobrevivência. Usar alimento como comparativo pode ser bastante valioso em propiciar boas condições de bem-estar (Warburton & Mason, 2003; Seaman *et al.*, 2008). É razoável pensar que quando o esforço para obter alguma condição específica for próximo ao de obter alimento, essa condição mostra ser tão relevante quanto alimento, sendo assim, seria importante providenciá-la no intuito de melhorar as condições de bem-estar.

Nesse contexto motivacional, alguns estudos manipularam o nível de privação alimentar (energia disponível) para avaliar a motivação em obter alimento (*e.g.*; Savory & Lariviere, 2000; Bokkers *et al.*, 2004; Schütz *et al.*, 2006). Essa é uma questão importante nos estudos motivacionais que envolvem custo físico (Asher *et al.*, 2009), no caso, o esforço para obter recursos. Assim, como isso não foi testado em peixes, também investigamos se o aumento de jejum aumenta a motivação para obter alimento (terceira hipótese - iii).

## **2. Material e Métodos**

### *2.1. Delineamento*

Os peixes foram individualizados em aquários de vidro de mesma dimensão e estruturas internas apresentadas no Capítulo 4, sendo que um lado dispunha de recurso(s). Após 50 h de permanência no aquário, avaliamos o esforço para obter o(s) recurso(s). Os seguintes grupos ( $N = 8$ ) foram formados e contavam com um ou mais recursos:

- Sedimento: camada de 3 cm de sedimento de rio com granulometria média de 0,57 ± 0,07 cm idêntico ao descrito nos Capítulos 1 e 4;
- Cor ambiental amarela: um lado do aquário coberto (frontal e metade da parte superior) por uma camada de celofane amarelo;
- Toca: um tubo de PVC branco com 10 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro fixado no fundo do aquário a 5 cm da parede posterior, lateral e anteparo, idêntico ao utilizado no Capítulo 4;
- SC: Sedimento + Cor amarela;
- ST: Sedimento + uma Toca;
- CT: Cor amarela + uma Toca;
- SCT: Sedimento + Cor amarela + uma Toca;
- Alimento 24 h: Alimento disponibilizado no momento em que avaliamos o esforço para peixes em jejum de 24 h;
- Alimento 48 h: Alimento disponibilizado no momento em que avaliamos o esforço para peixes em jejum de 48 h;

## 2.2. Procedimentos

Após 48 h de permanência no aquário e quando o peixe estava no recinto preferencial (observado por vídeo-monitoramento), o translocamos para o recinto vazio através da porta com o auxílio de um anteparo de PVC. Os peixes dos grupos que tiveram o alimento como estímulo foram translocados independentemente do lado em que se encontravam e, no instante seguinte, foi oferecido o alimento no recinto oposto ao peixe. Para todos os grupos, testamos 4 peixes com o(s) recurso(s) dispostos na esquerda e outros 4 na direita. Os peixes dentro da toca foram gentilmente retirados da mesma com auxílio de uma pequena mangueira de plástico transparente de 1 cm de diâmetro. Logo após a translocação, a porta era bloqueada parcialmente com uma vareta de acrílico de forma que permitisse a abertura parcial da mesma, mas não a passagem do peixe. Filmamos os aquários por 1 h, entre 9:00 h e 15:00 h de maneira aleatória.

Registramos o tempo decorrido para o peixe deflagrar o primeiro toque na porta (latência), assim como o número e a quantidade de toques balanceada pelo tempo disponível (taxa de toque). O toque foi definido pelo contato da ponta do focinho (Galhardo *et al.*,

2011), boca ou mordida na porta. Comparamos os dados dos grupos de recurso(s) não alimentar(es) junto com o de alimento em jejum de 24 h para testar as duas primeiras hipóteses (i - aumento do esforço com aumento do número de recursos; ii - esforço para obter alimento é maior do que para obter recurso(s) não alimentar(es)). Para a terceira (iii) hipótese (aumento de jejum aumenta a motivação para obter alimento), comparamos os dados entre os grupos de alimento. A análise das filmagens dos grupos de alimento foi realizada baseada no método “duplo-cego”, ou seja, sem o conhecimento do grupo ao qual pertencia o peixe (24 h ou 48 h de jejum).

Cada recinto do aquário apresentava a aeração independente na mesma intensidade e posição relativa. A alimentação foi oferecida 2 h após os peixes de todos os grupos serem individualizados em aquários. O alimento também foi oferecido 24 h antes da amostragem para todos os grupos, com exceção do grupo em jejum de 48 h. O alimento foi distribuído na mesma quantidade nos dois recintos e o excesso retirado com auxílio de puçá após 40 min. O comprimento padrão (CP) dos peixes e a temperatura não diferiram entre os grupos para avaliar as hipóteses (i) e (ii) (ANOVA:  $F_{7,56} = 1,62$ ;  $P = 0,15$  para CP e  $F_{7,56} = 1,00$ ;  $P = 0,44$  para temperatura), bem como para a (iii) (Teste  $t$  de Student independente:  $t_{14} = 0,17$ ;  $P = 0,87$  para CP e  $t_{14} = 0,48$ ;  $P = 0,64$  para temperatura) e os dados encontram-se na Tabela 8. A intensidade luminosa nos aquários foi de  $\sim 120$  lux. Para os grupos que contavam com a cor ambiental amarela, o outro lado do aquário foi coberto com celofane transparente (1 a 3 camadas) para equilibrar a intensidade de luz com a do lado do(s) recurso(s).

**Tabela 8:** Temperatura e biometria (média  $\pm$  d.p.m.) nos grupos estudados. ( $N = 8$ ).

<i>Grupos</i>	<b>Temperatura (T°C)</b>	<b>Comprimento Padrão (cm)</b>
<i>Sedimento (S)</i>	24,5 $\pm$ 1,3	6,61 $\pm$ 0,48
<i>Cor (C)</i>	24,2 $\pm$ 0,6	6,76 $\pm$ 1,03
<i>Toca (T)</i>	24,6 $\pm$ 1,1	6,83 $\pm$ 0,81
<i>SC (S+C)</i>	24,0 $\pm$ 0,5	6,80 $\pm$ 0,56
<i>ST (S+T)</i>	24,6 $\pm$ 0,8	7,35 $\pm$ 0,63
<i>CT (C+T)</i>	24,6 $\pm$ 0,9	7,38 $\pm$ 0,69
<i>SCT (S+C+T)</i>	24,7 $\pm$ 1,1	7,31 $\pm$ 0,73
<i>Alimento 24 h</i>	23,9 $\pm$ 0,6	6,78 $\pm$ 0,45
<i>Alimento 48 h</i>	24,0 $\pm$ 0,4	6,74 $\pm$ 0,41
<b>Média</b>	24,2 $\pm$ 0,6	6,95 $\pm$ 0,69

### 2.3. Análise estatística

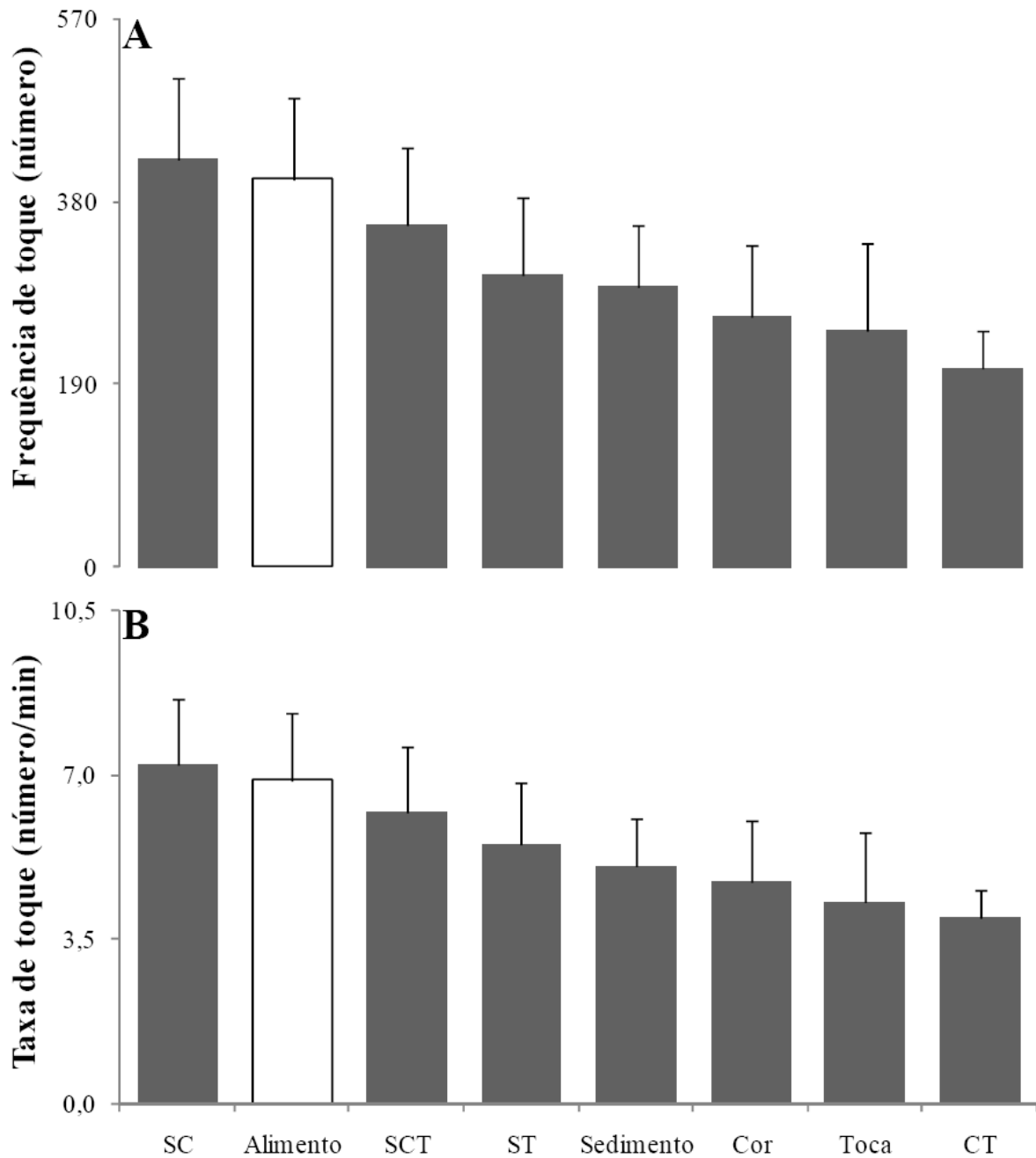
Transformamos os dados por  $\sqrt{(x + 0,5)}$  para utilizar os testes paramétricos, onde se adequaram com a homocedasticidade (Teste de Levene) e a normalidade (Teste de Kolmogorov-Smirnov). Comparamos os dados totais de esforço entre os grupos de recurso(s) não alimentar(es) juntamente com o do grupo de alimento em jejum de 24 h por ANOVA de uma via. O Teste *t* de Student independente foi empregado na comparação dos dados totais de esforço entre os dois grupos de alimento. A ANOVA de medida repetida foi utilizada para os dados divididos em períodos de 15 min em duas análises: entre os grupos de recurso(s) não alimentar(es) junto com alimento em jejum de 24 h e entre os dois grupos de alimento. O Pós-teste LSD foi empregado em todos os casos. Ordenamos as médias dos dados de esforço nos primeiros 15 min dos grupos de recurso(s) não alimentar(es) juntamente com o grupo de alimento em jejum de 24 h e posteriormente realizamos uma correlação de Pearson entre essa ordenação das médias dos grupos e os dados de esforço. Diferença estatística foi considerada quando  $P < 0,05$ .

## 3. Resultados

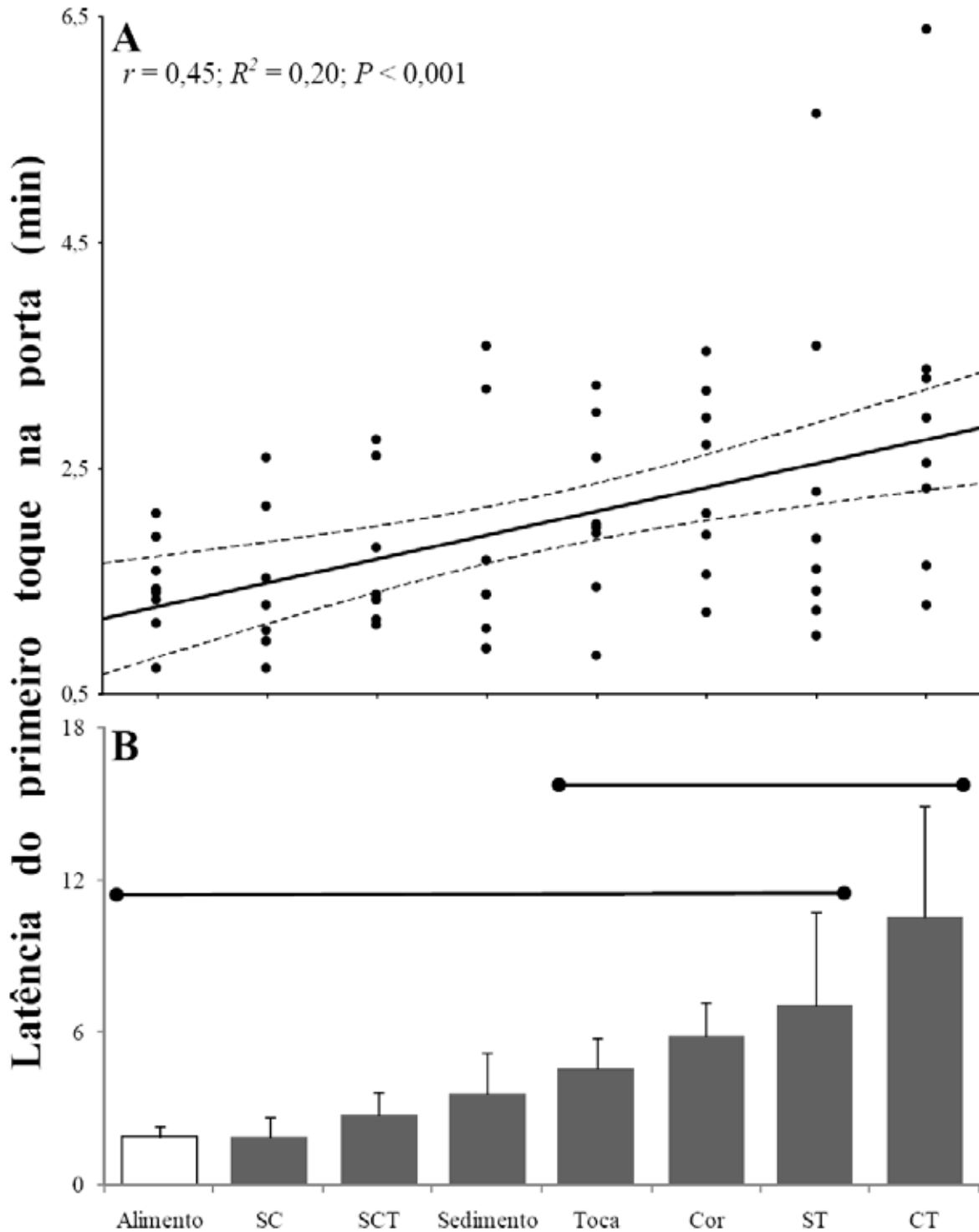
Todos os peixes avaliados, independentemente do grupo, tocaram a porta no período de observação de 1 h.

*3.1. Hipóteses (i - aumento do esforço com aumento do número de recursos) e (ii - esforço para obter alimento é maior do que para obter recurso(s) não alimentar(es))*

Não houve diferença na frequência (ANOVA:  $F_{7,56} = 1,01$ ;  $P = 0,44$ ) e na taxa (ANOVA:  $F_{7,56} = 1,01$ ;  $P = 0,43$ ) de toque total entre os grupos (Figura 25). Entretanto a ordenação das médias de latência foi correlacionada significativamente (Figura 26A). Além disso, existiu diferença na latência para o primeiro toque na porta (ANOVA:  $F_{7,56} = 2,19$ ;  $P < 0,05$ ), sendo CT maior que Alimento, porém igual à Toca, Cor e ST (Figura 26B).

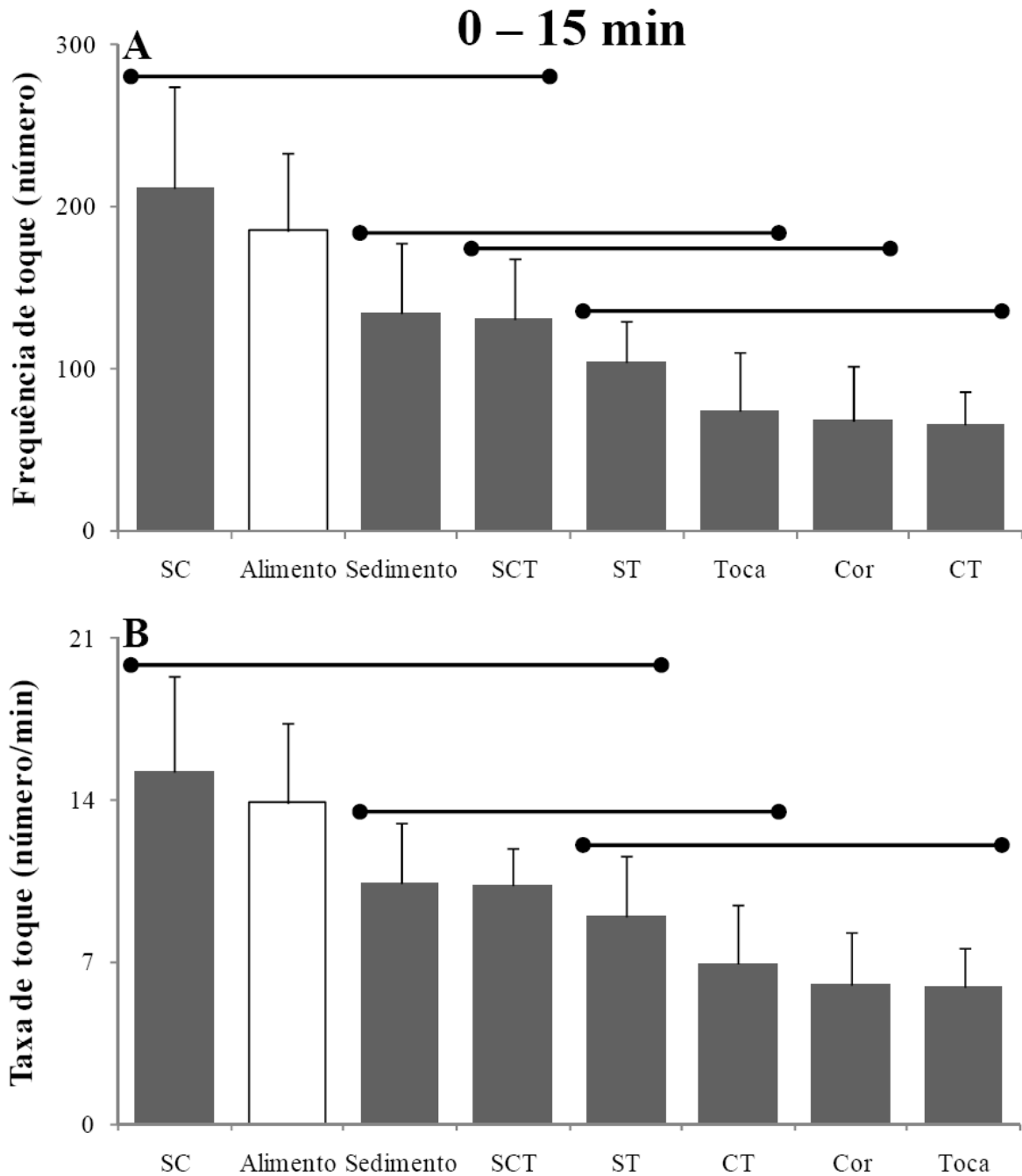


**Figura 25:** Frequência (A) e taxa (B) de toque (média  $\pm$  e.p.m.) na porta de acesso ao(s) respectivo(s) recurso(s), somados ou não. Os recursos foram agrupados em ordem decrescente da resposta. S: Sedimento; C: Cor ambiental amarela; T: Toca. Não houve diferença estatística entre os grupos.  $N = 8$ .

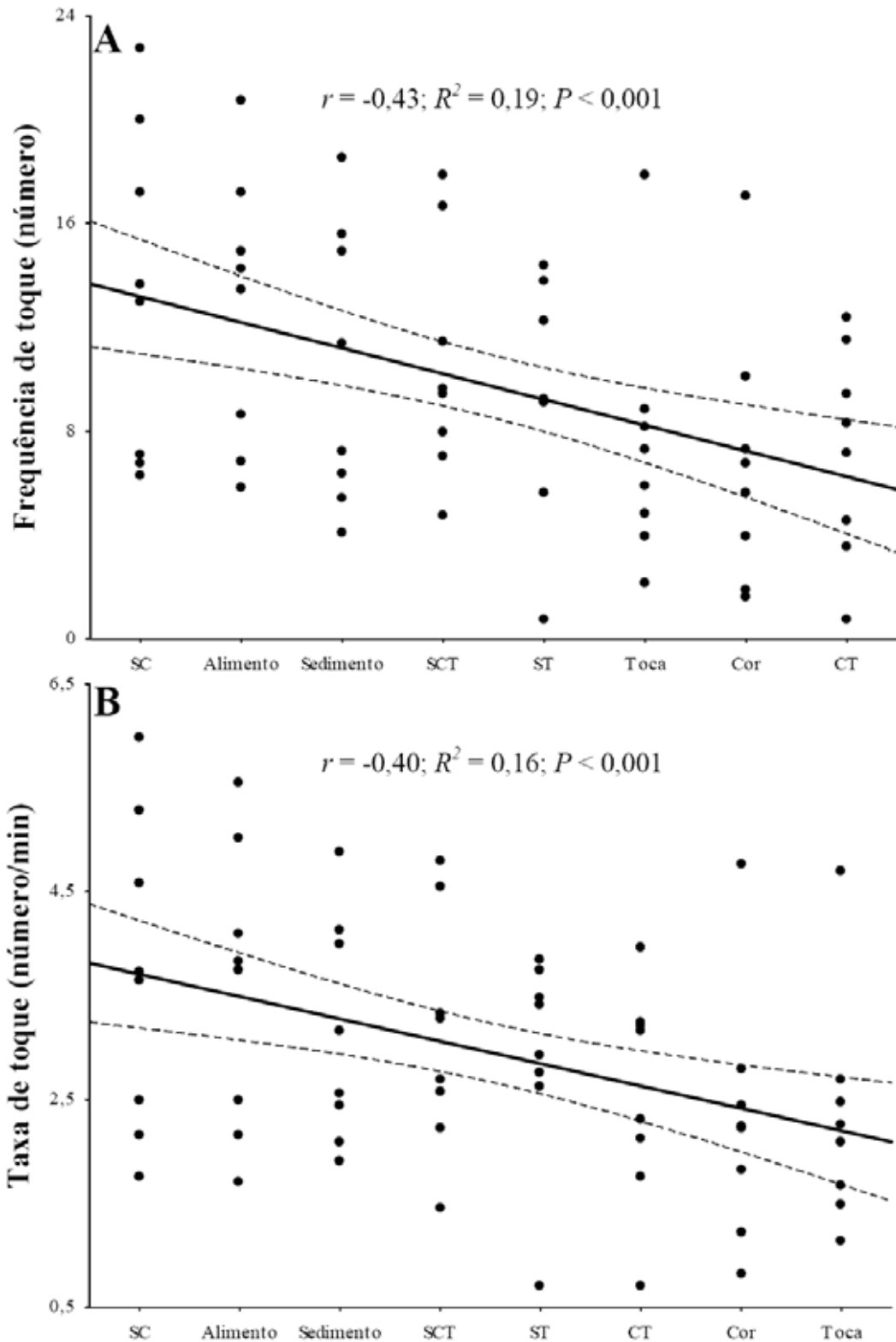


**Figura 26:** Latência para o primeiro toque na porta de acesso ao(s) respectivo(s) recurso(s), somados ou não. A: Correlação de Pearson entre a ordenação crescente da média da latência dos grupos e os respectivos dados de latência transformados por  $\sqrt{(x + 0,5)}$ . B: Média  $\pm$  e.p.m. da latência, onde os recursos foram agrupados em ordem crescente de resposta. S: Sedimento; C: Cor ambiental amarela; T: Toca. As colunas que contemplam a mesma barra acima das mesmas não denotam diferença estatística em B.  $N = 8$ .

Tanto a análise da frequência (ANOVA:  $F_{7,56} = 13,09$ ;  $P < 0,001$ ) quanto a da taxa (ANOVA:  $F_{7,56} = 26,78$ ;  $P < 0,001$ ) de toque na porta por períodos de 15 min mostraram o efeito dos períodos na resposta. A frequência e a taxa de toque na porta diminuíram ao longo do tempo, independente do grupo de recurso(s) e não foi mostrada graficamente. Porém, nos dois casos as diferenças entre os grupos somente foram presentes nos primeiros 15 min e são mostradas na Figura 27. A resposta dos peixes para SC, Sedimento, SCT e ST, sendo esse último somente para a taxa de toque, foi igual para Alimento. As médias dos grupos da Figura 27 foram correlacionadas significativamente de acordo com a ordenação das mesmas (Figura 28).



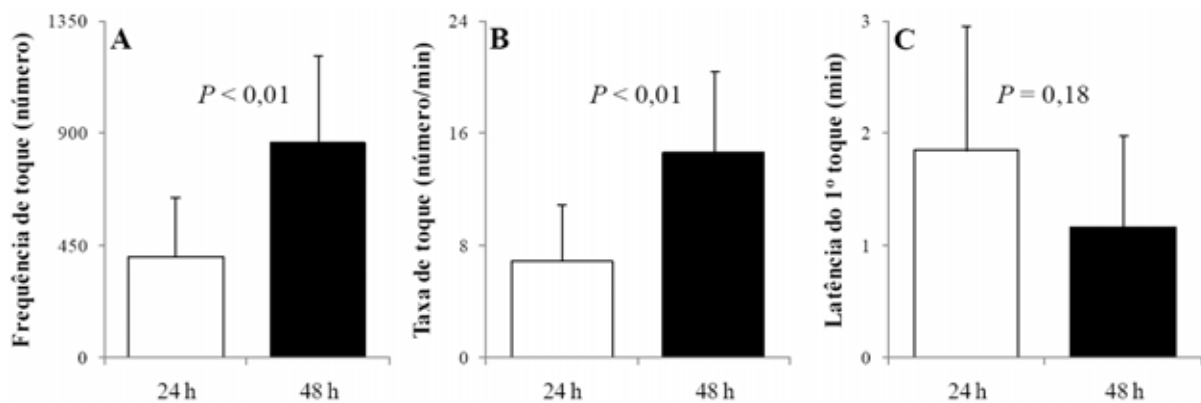
**Figura 27:** Frequência (A) e taxa (B) de toque (média  $\pm$  e.p.m.) na porta de acesso ao(s) respectivo(s) recurso(s), somados ou não, nos primeiros 15 min. Os recursos foram agrupados em ordem decrescente de resposta. S: Sedimento; C: Cor ambiental amarela; T: Toca. As colunas que contemplam a mesma barra acima das mesmas não denotam diferença estatística.  $N = 8$ .



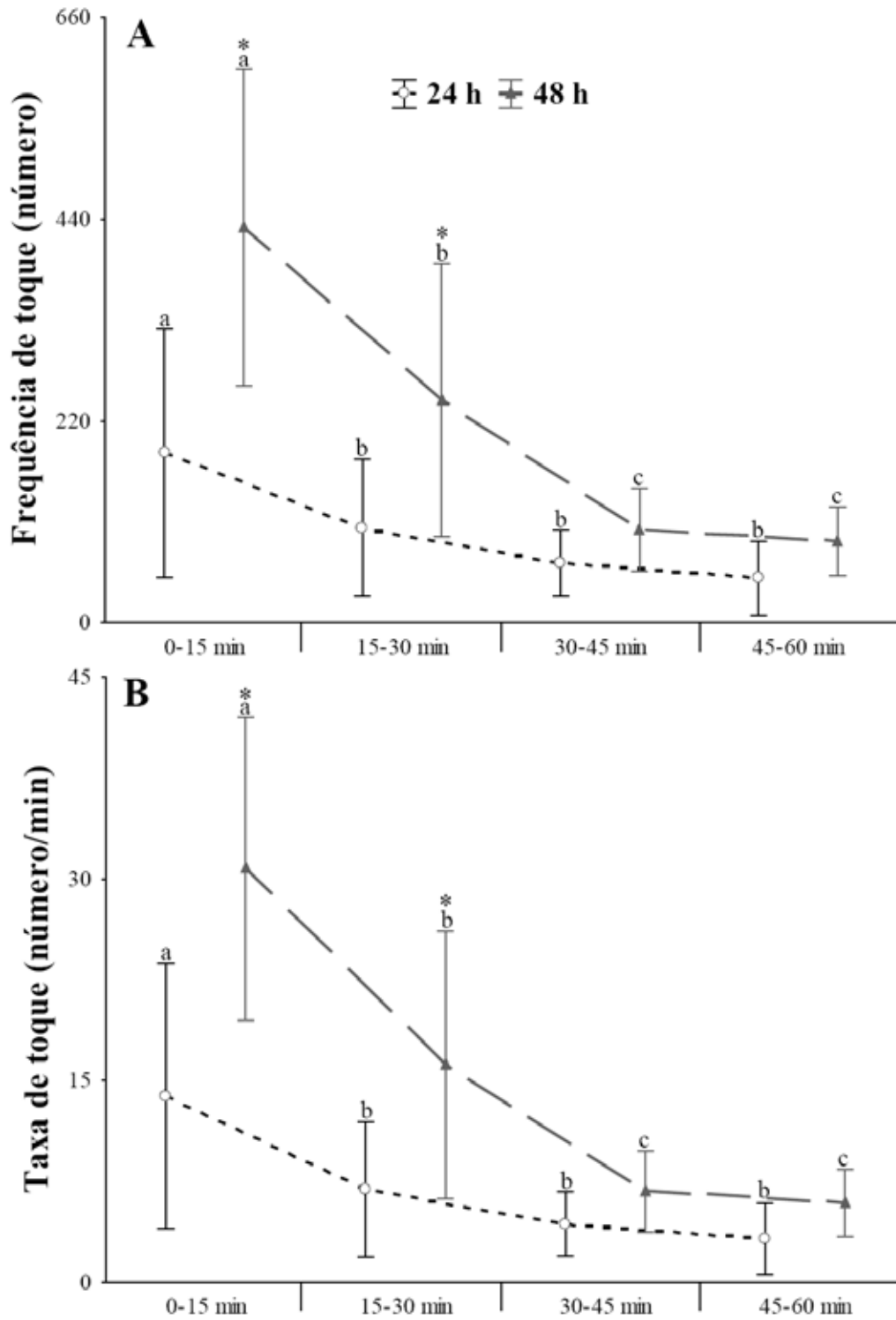
**Figura 28:** Correlação de Pearson entre a ordenação decrescente da média dos grupos da frequência (A) e da taxa (B) de toque na porta de acesso ao(s) respectivo(s) recurso(s), somados ou não, e os próprios dados de frequência (A) e de taxa (B). S: Sedimento; C: Cor ambiental amarela; T: Toca. Dados dos primeiros 15 min transformados por  $\sqrt{(x + 0,5)}$ .  $N = 8$ .

### 3.2. Hipótese (iii - aumento de jejum aumenta a motivação para obter alimento)

A Figura 29 mostrou que as tilápias em jejum de 48 h apresentaram maior frequência ( $t_{14} = 3,08$ ;  $P < 0,01$ ) e taxa ( $t_{14} = 3,10$ ;  $P < 0,01$ ) total de toque na porta de acesso ao alimento que as de jejum de 24 h. Também existiu diferença entre os dois grupos na interação com os períodos de 15 min (ANOVA:  $F_{1,14} = 6,28$ ;  $P < 0,01$  para frequência e  $F_{1,14} = 6,28$ ;  $P < 0,01$  para taxa de toque). Tais diferenças concentraram-se nos primeiros 30 min, sendo iguais nos 30 min finais. Houve também, para os dois grupos, uma diminuição da frequência e da taxa de toque ao longo do tempo, estabilizando nos últimos 30 min (Figura 30). Entretanto, a latência para o primeiro toque na porta foi igual, independentemente do tempo de jejum (Figura 29C:  $t_{14} = 1,41$ ;  $P = 0,18$ ).



**Figura 29:** Dados médios ( $\pm$  d.p.m.) da frequência (A), taxa de toque (B) e latência para primeiro toque (C) na porta de acesso ao lado com alimento para os grupos de jejum de 24 h e 48 h.  $N = 8$ .



**Figura 30:** Dados médios ( $\pm$  d.p.m.) da frequência (A) e da taxa de toque (B) na porta de acesso ao alimento para os grupos de jejum de 24 h e 48 h. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os períodos de 15 min para cada grupo. Asterisco (\*) indica diferença entre os grupos no período de 15 min.  $N = 8$ .

#### 4. Discussão

A hipótese (i) de que a motivação aumenta com a adição de recursos foi negada, provavelmente devido ao valor razoavelmente alto de um único recurso testado por si só e, mais ainda, pelo sedimento constituir-se como um elemento importante para a tilápia-do-Nilo. Isso é corroborado pela negação, também, da hipótese (ii) de que o “preço pago” por um recurso de sobrevivência básica, alimento, seria maior que outros recursos. Essa hipótese também foi negada, pois o sedimento, associado ou não a outros recursos, mostrou igual valor ao alimento em um mesmo tempo de jejum (24 h). A hipótese (iii), entretanto, foi a única aceita, pois o jejum de 48 h aumentou a motivação alimentar.

O Capítulo anterior (4) mostrou que os três recursos testados separadamente são importantes para a tilápia, onde, ao menos em uma das variáveis analisadas, a resposta é maior que a do respectivo controle. Entretanto, a soma desses recursos não aumentou a motivação do peixe em obtê-los quando a resposta foi analisada por 1 h. Assim, o “preço pago” para obter um desses recursos é o mesmo que para obter mais de um deles. A explicação mais parcimoniosa seria que um desses recursos é tão motivador quanto os três juntos. Nos primeiros 15 min, observa-se que associando sedimento à cor amarela ( $C \times CS$ ; Figura 27) e sedimento ao amarelo com toca ( $CT \times SCT$ ; Figura 27A), o peixe aumenta o esforço para obter os recursos, sugerindo que o recurso sedimento seja o diferencial para aumentar a motivação. Corroborando esse fato, SC e SCT são iguais ao grupo de sedimento sozinho. De qualquer maneira, comprovamos que a quantidade de recursos não é o fator primordial em técnicas de enriquecimento, mas a qualidade do recurso é fundamental.

Outro resultado intrigante do presente estudo e que complementa a importância dos recursos, bem como a importância do sedimento, é a negação, também, da hipótese (ii). Embora os peixes nos grupos de recurso(s) não alimentar(es) tenham exibido frequência e taxa de toque similares no período total de 1 h, os dados da latência e dos primeiros 15 min, bem como as suas correlações com a ordenação dos recursos, sustentam a idéia de que existam algumas diferenças. Os grupos S, SC e SCT apresentaram mesma resposta que aquela em relação ao alimento, em todas as análises (Figuras 26B e 27), mostrando motivações iguais em relação ao alimento, um recurso primário (fisiológico essencial de acordo com Mason *et al.*, 2001). O outro grupo que também apresentava sedimento, ST, só não foi igual ao alimento na frequência de toque nos primeiros 15 min, mostrando também ser importante. A presença de sedimento somente nesses grupos corrobora o fato de que tal

recurso é valioso para a tilápia (Galhardo *et al.*, 2008, 2009; Mendonça *et al.*, 2010; Capítulos 1 e 4). Como o sedimento oferece oportunidade para construção de ninho para reprodução da tilápia-do-Nilo (Mendonça & Gonçalves-de-Freitas, 2008; Mendonça *et al.*, 2010; Capítulo 1), sugerimos que tal necessidade comportamental deva ser tão relevante quanto alimentar-se para essa espécie, quando o período de privação de alimento não for tão prolongado (um dia). Isso subentende que a relevância de um recurso depende não apenas de sua natureza, mas de uma interação com a carência imediata do animal em relação a ele.

O alimento normalmente figura como o recurso mais importante para o animal em testes motivacionais (*e.g.* Matthews & Ladewig, 1994; Warburton & Mason, 2003; Hovland *et al.*, 2006; Seaman *et al.*, 2008). Em porcos, o alimento é mais importante que o contato social ou a vontade de abrir porta (Matthews & Ladewig, 1994). O “preço máximo pago” por machos da raposa *Vulpes vulpes* por comida é mais alto que aquele “preço” para ter acesso a fêmeas no cio, bem como ter contato com outros machos (Hovland *et al.*, 2006). Para a *Mustela vision*, o esforço direcionado para o alimento também foi maior que aquele realizado para alcançar brinquedos, contato social ou piscina para banho (Mason *et al.*, 2001; Warburton & Mason, 2003). Porém, embora o “preço pago” por alimento seja o mais alto, não quer dizer que a privação desse recurso é a que geraria maior estresse para o animal. Nesse mesmo estudo do mustelídeo, Mason *et al.* (2001) mostram que o aumento do nível de cortisol gerado pela privação de alimento é o mesmo que privar o animal de nadar. Assim, como mostramos que a motivação para obter alimento é a mesma que para obter sedimento, associado ou não aos outros recursos, sugerimos que privar a tilápia de construir ninho possa ser tão prejudicial quanto privá-la de alimentar-se por 24 h. Em outra espécie de tilápia, *O. mossambicus*, o contato social para reprodução também é tão relevante quanto alimento (Galhardo *et al.*, 2011), sugerindo que os contextos de reprodução e alimentação tenham valores próximos em ciclídeos.

A motivação inicial para obter alimento, mensurada pela latência para tocar a porta de acesso ao alimento pela primeira vez, é independente do tempo de jejum (Figura 29C), o que sugere que o peixe tem vontade de alimentar-se de um dia para o outro. Em contraposição, a latência é dependente da privação alimentar para galinhas. Essas, quando restritas a 50% da alimentação diária, respondem mais rapidamente em direção ao alimentador que as restritas em 75% (Bokkers *et al.* 2004). Entretanto, o “preço” que a tilápia “paga” quando está num jejum mais prolongado é maior (Figuras 29A e 29B), assim como as galinhas (Bokkers *et al.* 2004) e como em vacas (Schütz *et al.*, 2006). Portanto, a

latência ao estímulo motivador para desencadear um comportamento pode ser tanto dependente (Bokkers *et al.* 2004) quanto independente (presente estudo) do “preço” que o animal “paga”, sugerindo que essas duas variáveis sejam complementares na avaliação motivacional. A latência do pintado, *Pseudoplatystoma coruscans*, para se alimentar é a mesma, esteja alimentado ou em jejum de 8 dias (Giaquinto & Volpato, 2001). Entretanto, sob ameaça de predação, o tempo de resposta para alimentar-se aumenta somente para os peixes alimentados (Giaquinto & Volpato, 2001). Esses autores sugerem que o estado interno não seja igual entre peixes alimentados e em jejum. Nosso estudo também pode sugerir isso, uma vez que, a motivação para alimentar-se foi a mesma (igual latência), mas o “preço pago” (toques na porta) foi diferente.

A intensidade motivacional decaiu ao longo do tempo para todos os recursos, inclusive alimento. Assim, como também sugerido em estudos de outros grupos taxonômicos (*e.g.* Lewis, 1999; Gluck & Sackett, 1974), sugere-se que haja algum elemento de frustração (atividade almejada, mas não obtida) nessa situação. Colombo *et al.* (em preparação<sup>5</sup>) demonstram condições de frustração comportamental em peixes, como também sugerido neste capítulo.

Como discutido anteriormente, o sedimento é importante para o bem-estar de peixes que o usam para a construção de ninhos (*e.g.* Galhardo *et al.*, 2008, 2009; Mendonça & Gonçalves-de-Freitas, 2008; Mendonça *et al.*, 2010; Capítulo 1, 4). Porém, adicionar sedimento em sistemas de manutenção de peixes pode gerar alguns problemas. Nesse caso, um dos maiores entraves na adição de sedimento como enriquecimento ambiental é a propensão de crescimento de microorganismos além do aumento de matéria orgânica (Willians *et al.*, 2009). Assim, o uso de sedimento deve ser bem planejado para que realmente proporcione condições de bem-estar.

## CONCLUSÕES GERAIS

- A tilápia-do-Nilo prefere visitar sedimento com grânulos próximos a 60% de sua amplitude bucal;
- A preferência de visita por sedimento também pode estar associada com atividades de forrageamento;
- O sedimento de menor granulometria é o mais escolhido para construção de ninho;
- A espécie escolhe preferencialmente a cor ambiental amarela abaixo de 200 lux;
- Abaixo de 200 lux, a preferência é em torno de 80 lux pela manhã, porém a tarde não existe uma preferência nítida e o número de peixes indecisos é maior;
- A tomada de decisão por recursos preferenciais é mais pontual pela manhã;
- Por análise do esforço empreendido, o sedimento é o mais importante, entretanto, por análise das escolhas, a tilápia prefere tocas;
- O emprego dessas duas metodologias (escolha e esforço) deve ser considerado na avaliação de itens de enriquecimento visando boas condições de bem-estar;
- Ter acesso a sedimento pode ser tão importante quanto alimentar-se para a tilápia;
- O aumento de itens de recurso não aumentou o interesse em obtê-los, portanto sugerimos que qualidade do enriquecimento seja preponderante à quantidade;
- O tempo de 48 h de jejum aumenta o esforço que a tilápia “paga” para obter alimento em comparação com 24 h de jejum. Entretanto, a latência para alimentar-se é igual para esses dois períodos de jejum;
- De maneira prática, oferecer sedimento parece importante na melhoria do bem-estar de espécies de peixes que o utilizam para reprodução, porém deve ser empregado corretamente para que alcance esse objetivo;
- Oferecer recursos para os peixes pode melhorar as condições de bem-estar, uma vez que têm motivação para obtê-los, mas isso deve ser preponderado para que realmente tenha esse efeito benéfico.

*“The more we come to understand other animals, the more we will appreciate them as the amazing beings they are, and the more we will come to understand ourselves.”*

Mark Bekoff (2006, Zygon 41:71–104)

## REFERÊNCIAS

- Albentosa MJ, Cooper JJ. 2005. Testing resource value in group-housed animals An investigation of cage height preference in laying hens. **Behav Proces** 70: 113–121.
- Arlinghaus R, Cooke SJ, Schwab A, Cowx IG. 2007. Fish welfare: a challenge of the feelings-based approach, with implications for recreational fishing. **Fish Fish** 8: 57–71.
- Arlinghaus R, Schwab A, Cooke SJ, Cowx IG. 2009. Contrasting pragmatic and suffering-centred approaches to fish welfare in recreational angling. **J Fish Biol** 75: 2448–2463.
- Asher L, Kirkden RD, Bateson M. 2009. An empirical investigation of two assumptions of motivation testing in captive starlings (*Sturnus vulgaris*): Do animals have an energy budget to ‘spend’? and does cost reduce demand? **Appl Anim Behav Sci** 118:152–160.
- Ashley PJ, 2007. Fish welfare: current issues in aquaculture. **Appl Anim Behav Sci** 104: 199–235.
- Atkinson CJL, Bergmann M, Kaiser MJ. 2004. Habitat selection in whiting. **J Fish Biol** 64:788–793.
- Balon EK. 2000. Defending fish against recreational fishing: an old problem to be solved in the new millennium. **Environ Biol Fish** 57:1–8.
- Barcellos LJG, Ritter F, Kreutz LC, Cericato L, Quevedo RM. 2006. The color of illumination affects the stress response of jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, Heptapteridae). **Ciência Rural** 36: 1249–1252.
- Barcellos LJG, Kreutz LC, Quevedo RM, Rosa JGS, Koakoski G, Centenaro L, Pottker E. 2009. Influence of color background and shelter availability on jundiá (*Rhamdia quelen*) stress response. **Aquaculture** 288: 51–56.
- Barreto RE, Volpato GL. 2006. Stress responses of the fish Nile tilapia subjected to electroshock and social stressors. **Braz J Med Biol Res** 39: 1605–1612.
- Barreto RE, Volpato GL. 2007. Evaluating feeding as unconditioned stimulus for conditioning of an endocrine effect in Nile tilapia. **Physiol Behav** 92: 867–872.
- Biswas AK, Endo M, Takeuchi T. 2002. Effect of different photoperiod cycles on metabolic rate and energy loss of both fed and unfed young tilapia *Oreochromis niloticus*: part I. **Fisheries Sci** 68:465–477.
- Biswas AK, Takeuchi T. 2002. Effect of different photoperiod cycles on metabolic rate and energy loss of both fed and unfed adult tilapia *Oreochromis niloticus*: part II. **Fisheries Sci** 68:543–553.
- Bokkers EAM, Koene P, Rodenburg TB, Zimmerman PH, Spruijt BM. 2004. Working for food under conditions of varying motivation in broilers. **Anim Behav** 68: 105–113.
- Bouef G, Le Bail PY. 1999. Does light have an influence on fish growth? **Aquaculture** 177, 129–152.

- Browne WJ, Caplen G, Edgar J, Wilson LR, Nicol CJ. 2010. Consistency, transitivity and inter-relationships between measures of choice in environmental preference tests with chickens. **Behav Process** 83: 72–78.
- Brydges NM, Braithwaite VA. 2008. Measuring animal welfare: what can cognition contribute?. **Ann Rev Biomed Sci** 10: 91–103.
- Chandroo KP, Duncan IJH, Moccia RD. 2004. Can fish suffer?: perspectives on sentience, pain, fear and stress. **Appl Anim Behav Sci** 86:225–250.
- Conte FS . 2004. Stress and the welfare of cultured fish. **Appl Anim Behav Sci** 86:205–223.
- Cooper JJ, Appleby MC. 1997. Motivational aspects of individual variation in response to nest boxes by laying hens. **Anim Behav** 54: 1245–1253.
- Copeland KA, Watanabe WO. 2006. Light intensity effects on early life stages of black sea bass, *Centropristis striata* (Linnaeus 1758). **Aqua Res** 37:1458–1463.
- Davey AJH, Doncaster CP, Jones OD. 2009. Distinguishing between interference and exploitation competition for shelter in a mobile fish population. **Environ Model Assess** 14: 555–562.
- Dawkins MS. 2006. Through animal eyes: what behaviour tell us. **Appl Anim Behav Sci** 100:4–10.
- Delicio HC, Barreto RE, Normandes EB, Luchiari AC, Marcondes AL. 2006. A place preference test in the fish Nile tilapia. **J Exp Anim Sci** 43: 141–148.
- Dias-Ferreira E, Sousa JC, Melo I, Morgado P, Mesquita AR, Cerqueira JJ, Costa RM, Sousa N. 2009. Chronic Stress Causes Frontostriatal Reorganization and Affects Decision-Making. **Science** 325: 621–625.
- Duncan IJH. 2006. The changing concept of animal sentience. **Appl Anim Behav Sci** 100:11–19.
- El-Sayed A-FM, Kawanna M. 2004. Effects of photoperiod on the performance of farmed Nile tilapia. I. Growth, feed utilization efficiency and survival of fry and fingerlings. **Aquaculture** 231:393–402.
- El-Sayed A-FM, Kawanna M. 2007. Effects of photoperiod on growth and spawning efficiency of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) broodstock in a recycling system. **Aqua Res** 38:1242–1247.
- Felício AKC, Rosa IL, Souto A, Freitas RHA. 2006. Feeding behavior of longsnout seahorse *Hippocampus reidi*. **J Ethol** 24: 219–225.
- Fortes-Silva R, Martínez FJ, Villarroel M, Sánchez-Vázquez FJ. 2010. Daily rhythms of locomotor activity, feeding behavior and dietary selection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Comp Biochem Phys A** 156: 445–450.
- Fraser D. 2009. Animal behaviour, animal welfare and the scientific study of affect. **Appl Anim Behav Sci** 118: 108–117.

- Galhardo L, Correia J, Oliveira RF. 2008. The effect of substrate availability on behavioural and physiological indicators of welfare in the African cichlid (*Oreochromis mossambicus*). **Anim Welfare** 17:239–254.
- Galhardo L, Almeida O, Oliveira RF. 2009. Preference for the presence of substrate in male cichlid fish: effects of social dominance and context. **Appl Anim Behav Sci** 120: 224–230.
- Galhardo L, Almeida O, Oliveira RF. 2011. Measuring motivation in a cichlid fish: An adaptation of the push-door paradigm. **Appl Anim Behav Sci** no prelo. doi:10.1016/j.applanim.2010.12.008.
- Giaquinto PC, Volpato GL. 2001. Hunger suppresses the onset and the freezing component of the antipredator response to conspecific skin extract in pintado catfish. **Behaviour** 138: 1205–1214.
- Gill AB. 2003. The dynamics of prey choice in fish: the importance of prey size and satiation. **J Fish Biol** 63: 105–116.
- Gluck JP, Sackett GP. 1974. Frustration and self-aggression in social isolate rhesus monkeys. **J Abn Psychol** 83: 331–334.
- Goodman LA. 1964. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. **Ann Math Stat** 35: 716–725.
- Goodman LA. 1965. On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. **Techometrics** 7: 247–254.
- Gwak WS. 2003. Effects of shelter on growth and survival in age-0 black sea bass, *Centropristis striata* (L.). **Aquac Res** 34:1387–1390.
- Hajós M, Siok CJ, Hoffmann WE, Li S, Kocsis B. 2008. Modulation of Hippocampal Theta Oscillation by Histamine H3 Receptors. **J Pharmacol Exp Ther** 324: 391–398.
- Han D, Xie S, Lei W, Zhu X, Yang Y. 2005. Effect of light intensity on growth, survival and skin color of juvenile Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris* Günther). **Aquaculture** 248: 299–306.
- Hovland AL, Mason G, Bøe KE, Steinheim G, Bakken M. 2006. Evaluation of the ‘maximum price paid’ as an index of motivational strength for farmed silver foxes (*Vulpes vulpes*). **Appl Anim Behav Sci** 100: 258–279.
- Huntingford FA, Adams C, Braithwaite VA, Kadri S, Pottinger TG, Sandoe P, Turnbull JF. 2006. Current issues in fish welfare. **J Fish Biol** 68: 332–372.
- Hursh SR, Raslear TG, Shurtleff D, Bauman R, Simmons L. 1988. A cost-benefit analysis of demand for food. **J Exp Anal Behav** 50: 419–440.
- Jennings RC. 1998. A philosophical consideration of awareness. **Appl Anim Behav Sci** 57:201–211.
- Jensen MB, Pedersen LJ. 2008. Using motivation tests to assess ethological needs and preferences. **Appl Anim Behav Sci** 113:340–356.

- Jensen P, Toates F. 1993. Who needs “behavioural needs”? Motivational aspects of the needs of animals. **Appl Anim Behav Sci** 37: 161–181.
- Job SD, Bellwood DR. 2000. Light sensitivity in larval fishes: implications for vertical zonation in the pelagic zone. **Limnol Oceanogr** 45: 362–371.
- Karakatsouli NP, Papoutsoglou SE, Manolessos G. 2007a. Combined effects of rearing density and tank colour on the growth and welfare of juvenile white sea bream *Diplodus sargus* L. in a recirculating water system. **Aquacult Res** 38: 1152–1160.
- Karakatsouli NP, Papoutsoglou SE, Pizzonia G, Tsatsos G, Tsopekos A, Chadio S, Kalogiannis D, Dalla C, Polissidis A, Papadopoulou-Daifoti Z. 2007b. Effects of light spectrum on growth and physiological status of gilthead seabream *Sparus aurata* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reared under recirculating system conditions. **Aquacult Eng** 36: 302–309.
- Karakatsouli NP, Papoutsoglou SE, Panopoulos G, Papoutsoglou ES, Chadio S, Kalogiannis, D. 2008. Effects of light spectrum on growth and stress response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reared under recirculating system conditions. **Aquacult Eng** 38: 36–42.
- Karakatsouli NP, Papoutsoglou ES, Sotiropoulos N, Mourtikas D, Stigen-Martinsen T, Papoutsoglou SE. 2010. Effects of light spectrum, rearing density and light intensity on growth performance of scaled and mirror common carp *Cyprinus carpio* reared under recirculating system conditions. **Aquacult Eng** 42: 121–127.
- Kirkden RD, Pajor EA. 2006. Using preference, motivation and aversion tests to ask scientific questions about animals’ feelings. **Appl Anim Behav Sci** 100: 29–47.
- Kolding J. 1993. Population-dynamics and life-history styles of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, in Ferguson Gulf, Lake Turkana, Kenya. **Env Biol Fish** 37: 25–46.
- Kruschwitz A, Zupan M, Buchwalder T, Huber-Eicher B. 2008. Nest preference of laying hens (*Gallus gallus domesticus*) and their motivation to exert themselves to gain nest access. **Appl Anim Behav Sci** 112: 321–330.
- Lehman H. 1998. Animal awareness. **Appl Anim Behav Sci** 57: 315–325.
- Lewis NJ. 1999. Frustration of goal-directed behaviour in swine. **Appl Anim Behav Sci** 64: 19–29.
- Lin Q, Lin J, Huang L. 2009. Effects of substrate color, light intensity and temperature on survival and skin color change of juvenile seahorses, *Hippocampus erectus* Perry, 1810. **Aquaculture** 298: 157–161.
- Lowe-McConnell M. 1958. Breeding behaviour patterns and ecological differences between tilapia species and their significance for evolution within the genus *Tilapia* (Pisces; Cichlidae). **Proc Zool Soc Lond** 132: 1–31.
- Luchiaro AC, Duarte CRA, Freire FAM, Nissinen K. 2007. Hierarchical status and colour preference in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **J Ethol** 25:169–175.

- Luchiari AC, Freire FAM. 2009. Effects of environmental colour on growth of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), maintained individually or in groups. **J Appl Ichthyol** 25: 162–167.
- Marchesan M, Spoto M, Verginella L, Ferrero EA. 2005. Behavioural effects of artificial light on fish species of commercial interest. **Fish Res** 73: 171–185.
- Mason G, McFarland D, Garner J. 1998. A demanding task: using economic techniques to assess animal priorities. **Anim Behav** 55: 1071–1075.
- Mason GJ, Cooper J, Clarebrough C. 2001. Frustrations of fur-farmed mink. **Nature** 410: 35–36.
- Matthews LR, Ladewig J. 1994. Environmental requirements of pigs measured by behavioral demand-functions. **Anim Behav** 47: 713–719.
- Mendonça FZ, Gonçalves-de-Freitas E. 2008. Nest deprivation and mating success in Nile tilapia (Teleostei, Cichlidae). **Rev Bras Zool** 25: 413–418.
- Mendonça FZ, Volpato GL, Costa-Ferreira RS, Gonçalves-de-Freitas E. 2010. Substratum choice for nesting in male Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **J Fish Biol** 77: 1439–1444.
- Millidine KJ, Armstrong JD, Metcalfe NB. 2006. Presence of shelter reduces maintenance metabolism of juvenile salmon. **Funct Ecol** 20: 839–845.
- Mortensen A, Ugedal O, Lund F. 2007. Seasonal variation in the temperature preference of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). **J Therm Biol** 32: 314–320.
- Owen MAG, Davies SJ, Sloman KA. 2010. Light colour influences the behaviour and stress physiology of captive tench (*Tinca tinca*). **Rev Fish Biol Fisher** 20: 375–380
- Papoutsoglou SE, Mylonakis G, Miliou H, Karakatsouli NP, Chadio S. 2000. Effects of background color on growth performances and physiological responses of scaled carp (*Cyprinus carpio* L.) reared in a closed circulated system. **Aquacult Eng** 22: 309–318.
- Peake S. 1999. Substrate preferences of juvenile hatchery-reared lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*. **Env Biol Fish** 56: 367–374.
- Phelan BA, Manderson JP, Stoner AW, Bejda AJ. 2001. Size-related shifts in the habitat associations of young-of-the-year winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*): field observations and laboratory experiments with sediments and prey. **J Exp Mar Biol Ecol** 257: 297–315.
- Puvanendran V, Brown JA. 2002. Foraging, growth and survival of Atlantic cod larvae reared in different light intensities and photoperiods. **Aquaculture** 248: 299–306.
- Ridha MT, Cruz EM. 2000. Effect of light intensity and photoperiod on Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L. seed production. **Aquacult Res** 31: 609–617.
- Rose JD. 2002 The neurobehavioral nature of fishes and the question of awareness and pain. **Rev Fish Sci** 10:1-38.
- Ruchin AB. 2004. Influence of colored light on growth rate of juveniles of fish. *Fish Physiol Biochem* 30: 175–178.

- Santos LN, Araújo FB, Brotto DS. 2008. Artificial structures as tools for fish habitat rehabilitation in a neotropical reservoir. **Aquat Conserv** 18: 896–908.
- Savory CJ, Lariviere J-M. 2000. Effects of qualitative and quantitative food restriction treatments on feeding motivational state and general activity level of growing broiler breeders. **Appl Anim Behav Sci** 69: 135–147.
- Schütz K, Davison D, Matthews L. 2006. Do different levels of moderate feed deprivation in dairy cows affect feeding motivation? **Appl Anim Behav Sci** 101: 253–263.
- Seaman SC, Waran NK, Mason G, D’earth RB. 2008. Animal economics: assessing the motivation of female laboratory rabbits to reach a platform, social contact and food. **Anim Behav** 75: 31–42.
- Serra EL, Medalha CC, Mattioli R. 1999. Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. **Braz J Med Biol Res** 32: 1551–1553.
- Sherwin CM. 2004. The motivation of group-housed laboratory mice *Mus musculus* for additional space. **Anim Behav** 67: 711–717.
- Sneddon LU. 2002. Anatomical and electrophysiological analysis of the trigeminal nerve in a teleost fish, *Oncorhynchus mykiss*. **Neurosci Lett** 319:167–171.
- Sneddon LU, Braithwaite VA, Gentle MJ .2003. Novel object test: Examining nociception and fear in the rainbow trout. **J Pain** 4:431–440.
- Sneddon LU. 2003a. Trigeminal somatosensory innervation of the head of a teleost fish with particular reference to nociception. **Brain Res** 972:44–52.
- Sneddon LU. 2003b. The evidence for pain in fish: the use of morphine as an analgesic. **Appl Anim Behav Sci** 83:153–162.
- Spady TC, Parry JW, Robinson PR, Hunt DM, Bowmaker JK, Carleton KL. 2006. Evolution of the Cichlid Visual Palette through Ontogenetic Subfunctionalization of the Opsin Gene Arrays. **Mol Biol Evol** 23:1538–1547.
- Spence R, Smith C. 2008. Innate and Learned Colour Preference in the Zebrafish, *Danio rerio*. **Ethology** 114: 582–588.
- Stennett CR, Strauss RE. 2010. Behavioural lateralization in zebrafish and four related species of minnows (Osteichthyes: Cyprinidae). **Anim Behav** 79: 1339–1342.
- Stoner AW, Abookire AA. 2002. Sediment preferences and size-specific distribution of young-of-the-year Pacific halibut in an Alaska nursery. **J Fish Biol** 61: 540–559.
- Strand A, Alanärä A, Staffan F, Magnhagen C. 2007. Effects of tank colour and light intensity on feed intake, growth rate and energy expenditure of juvenile Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L. **Aquaculture** 272: 312–318.
- Takemon Y, Nakanishi K. 1998. Reproductive success in female *Neolamprologus mondabu* (Cichlidae): influence of substrate types. **Env Biol Fish** 52: 261–269.
- Tamazouzt L, Chatain B, Fontaine P. 2000. Tank wall colour and light level affect growth and survival of Eurasian perch larvae (*Perca fluviatilis* L.). **Aquaculture** 182: 85–90.

- Trippel EA, Neil SRE. 2003. Effect of photoperiod and light intensity on growth and activity of juvenile haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). **Aquaculture** 217:633–645.
- Uddin MS, Farzana A, Fatema MK, Azim ME, Wahab MA, Verdegem MCJ. 2007. Technical evaluation of tilapia (*Oreochromis niloticus*) monoculture and tilapia–prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) polyculture in earthen ponds with or without substrates for periphyton development. **Aquaculture** 269: 232–240.
- Veissier I, Boissy A. 2007. Stress and welfare: two complementary concepts that are intrinsically related to the animal’s point of view. **Physiol Behav** 92: 429–433.
- Veissier I, Forkman B. 2008. The nature of animal welfare science. **Ann Rev Biomed Sci** 10: 15–26.
- Villamizar N, Blanco-Vives B, Migaud H, Davie A, Carboni S, Sánchez-Vázquez FJ. 2010. Effects of light during early larval development of some aquacultured teleosts: A review. **Aquaculture** no prelo. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.10.036.
- Volpato GL. 2000. Pesque-e-solte: uma análise crítica. **Revt Cient Plural** 1:9–20.
- Volpato GL 2007. Considerações Metodológica Sobre os Testes de Preferência na Avaliação do Bem-Estar em Peixes. **Anais da 44º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Jaboticabal, SP.** 1–21.
- Volpato GL. 2009. Challenges in Assessing Fish Welfare. **ILAR J** 50: 329–337.
- Volpato GL, Barreto RE. 2001. Environmental blue light prevents stress in the fish Nile tilapia. **Braz J Med Biol Res** 34: 1041–1045.
- Volpato GL, Trajano E. 2006. Biological Rhythms. In: Val AL, Almeida-Val VMF, Randal DJ (Eds). **The Physiology of Tropical Fishes**. Academic Press. 21: 101–153.
- Volpato GL, Duarte CRA, Luchiarri AC. 2004. Environmental color affects Nile tilapia reproduction. **Braz J Med Biol Res** 37: 479–483.
- Volpato GL, Gonçalves-de-Freitas E, Castilho MF. 2007. New insights into the concept of fish welfare. **Dis Aquat Org** 75: 165–171.
- Volpato GL, Giaquinto, PC, Fernandes-de-Castilho M, Barreto RE, Gonçalves-de-Freitas E. 2009. Animal welfare: From concepts to reality. **Oecol Bras** 13: 5–15.
- Warburton H, Mason G. 2003. Is out of sight out of mind? The effects of resource cues on motivation in mink, *Mustela vison*. **Anim Behav** 65: 755–762.
- Webster MM, Hart PJB. 2004. Substrate discrimination and preference in foraging fish. **Anim Behav** 68: 1071–1077.
- Williams TD, Readman GD, Owen SF. 2009. Key issues concerning environmental enrichment for laboratory-held fish species. **Lab Animal** 1–14.