

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAFAEL ORTIZ KRACIZY

"EFEITO AGUDO, COMBINADO E CRÔNICO DE AMÔNIA TOTAL E NITRITO  
PARA LARVAS DO CAMARÃO-DA-AMAZÔNIA *Macrobrachium amazonicum*  
(HELLER, 1862)"

CURITIBA

2022

RAFAEL ORTIZ KRACIZY

"EFEITO AGUDO, COMBINADO E CRÔNICO DE AMÔNIA TOTAL E NITRITO  
PARA LARVAS DO CAMARÃO-DA-AMAZÔNIA *Macrobrachium amazonicum*  
(HELLER, 1862)"

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS NA ÁREA DE ZOOLOGIA.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Luis Cupertino Ballester

CURITIBA

2022

Universidade Federal do Paraná. Sistemas de Bibliotecas.  
Biblioteca UFPR Palotina.

K91 Kracizy, Rafael Ortiz  
"Efeito agudo, combinado e crônico de amônia total e nitrito para  
larvas do camarão-da amazônia *Macrobrachium amazonicum*  
(Heller, 1862)" / Rafael Ortiz Kracizy. – Curitiba, PR, 2022.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de  
Ciências Biológicas, PR, Programa de Pós-Graduação em Zoologia.  
Orientador: Prof. Dr. Eduardo Luis Cupertino Ballester.

1. Compostos nitrogenados. 2. Efeito agudo. 3. Efeito crônico.  
4. Larvicultura. I. Ballester, Eduardo Luis Cupertino.  
II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDU 639

Bibliotecária: Aparecida Pereira dos Santos – CRB 9/1653



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ZOOLOGIA -  
40001016008P4

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ZOOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de RAFAEL ORTIZ KRACIZY intitulada: "Efeito agudo, combinado e crônico de amônia total e nitrato para larvas do camarão-da amazônia *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862)", sob orientação do Prof. Dr. EDUARDO LUIS CUPERTINO BALLESTER, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 08 de Setembro de 2022.

Assinatura Eletrônica  
12/09/2022 16:46:01.0

EDUARDO LUIS CUPERTINO BALLESTER  
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica  
13/09/2022 07:24:27.0

MARLISE TERESINHA MAUERWERK  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica  
13/09/2022 07:53:52.0  
MILTON RÖNNAU

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica  
12/09/2022 08:30:52.0  
KARINA RIBEIRO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE)

Avenida Cel Francisco H Santos, s/n - CURITIBA - Paraná - Brasil  
CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1641 - E-mail: pgzoo@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.  
Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 221643  
Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>  
e insira o código 221643

## RESUMO

Larvas de *Macrobrachium amazonicum* foram submetidas a três diferentes testes de exposição para investigar os efeitos de amônia total e nitrito na fase de larvicultura. No primeiro capítulo as larvas foram expostas ao efeito agudo dos compostos de forma isolada com o objetivo de encontrar a Concentração Letal Mediana (CL<sub>50</sub>) e o nível de segurança para cada período de 24 horas em um total de 96 horas de exposição. As concentrações escolhidas para amônia total foram (0, 10, 20, 40, 80 e 160 mg.L<sup>-1</sup>) enquanto que para nitrito as concentrações foram (0, 5, 10, 15, 20, 40, 80, 160 mg.L<sup>-1</sup>) em um sistema experimental randomizado com 4 réplicas por tratamento. Os valores de CL<sub>50</sub> de amônia total foram de 119,51; 94,25; 85,99 e 80,68 mg.L<sup>-1</sup> para 24, 48, 72 e 96 horas. Desta forma foram calculados os valores dos níveis de segurança para 24, 48, 72 e 96 horas que foram 11,95; 9,42; 8,59 e 8,06 mg.L<sup>-1</sup>. Para nitrito os valores de CL<sub>50</sub> foram de 96,55; 28,19; 15,58 e 15,36 mg.L<sup>-1</sup> para 24, 48 72 e 96 horas. Os valores dos níveis de segurança foram 9,65; 2,81; 1,55 e 1,53 mg.L<sup>-1</sup> para 24, 48, 72 e 96 horas. No segundo capítulo, investigou-se a interação aguda de amônia total e nitrito sobre larvas de *M. amazonicum* em desenho fatorial 4x4, sendo quatro concentrações de amônia total (0, 40, 80, 160 mg.L<sup>-1</sup>), quatro concentrações de nitrito (0, 7,5, 15, 30 mg.L<sup>-1</sup>) e suas combinações (40:7,5; 40:15; 40:30; 80:7,5; 80:15; 80:30; 160:7,5; 160:15; 160:30). Neste capítulo, observou-se, por meio do cálculo da soma da aditividade dos compostos e do índice de atividade, que a mortalidade causada pelos compostos combinados é 0,10 a 0,38 vezes menor em relação aos valores de mortalidade causada pelos compostos isoladamente, portanto, um efeito antagônico. No terceiro capítulo, as larvas foram submetidas à níveis sub-letais dos compostos, para isso foi utilizado um sistema experimental randomizado, com três réplicas por tratamento. Além de um tratamento controle (sem adição de amônia total ou nitrito), foram testadas as concentrações de 4, 8 e 16 mg.L<sup>-1</sup> para amônia total e 0,75; 1,5 e 3 mg.L<sup>-1</sup> para nitrito. Esses valores correspondem a metade dos níveis de segurança, o nível de segurança e o dobro do nível de segurança de cada composto calculado para 96 horas no Capítulo I. Foi possível observar que os níveis de toxicidade crônica de amônia total e nitrito não influenciaram significativamente nos valores de mortalidade, contudo, quando expostos ao dobro do nível de segurança dos compostos avaliados, pode-se observar um atraso no desenvolvimento larval de *M. amazonicum*. Os resultados dos estudos realizados apontaram a importância de determinar níveis seguros de compostos nitrogenados durante a larvicultura de *M. amazonicum* proporcionando valiosas informações para a produção de formas jovens em quantidade e qualidade.

Palavras-chave: Larvicultura. Zoea. Efeito agudo. Efeito crônico. Compostos Nitrogenados.

## ABSTRACT

*Macrobrachium amazonicum* larvae were subjected to three different exposure tests to investigate the effects of total ammonia and nitrite on the larval stage. In the first chapter, larvae were exposed to the acute effect of the compounds in isolation in order to find the Median Lethal Concentration (LC<sub>50</sub>) and the safety level for each 24 hour period for a total of 96 hours of exposure. The concentrations chosen for total ammonia were (0, 10, 20, 40, 80 and 160 mg.L<sup>-1</sup>) while for nitrite the doses were (0, 5, 10, 15, 20, 40, 80, 160 mg.L<sup>-1</sup>) in a randomized experimental system with 4 replicates per treatment. The LC<sub>50</sub> values for total ammonia were 119.51, 94.25, 85.99, and 80.68 mg.L<sup>-1</sup> for 24, 48, 72, and 96 hours. Thus the values of the safety levels for 24, 48, 72 and 96 hours were calculated to be 11.95; 9.42; 8.59 and 8.06 mg.L<sup>-1</sup>. For nitrite the LC<sub>50</sub> values were 96.55; 28.19; 15.58 and 15.36 mg.L<sup>-1</sup> for 24, 48, 72 and 96 hours. The values of the safe levels were 9.65; 2.81; 1.55 and 1.53 mg.L<sup>-1</sup> for 24, 48, 72 and 96 hours. In the second chapter, the acute interaction of total ammonia and nitrite was investigated in a 4x4 factorial design, being four concentrations of total ammonia (0, 40, 80, 160 mg.L<sup>-1</sup>), four concentrations of nitrite (0, 7.5, 15, 30 mg.L<sup>-1</sup>) and their combinations (40:7.5; 40:15; 40:30; 80:7.5; 80:15; 80:30; 160:7.5; 160:15; 160:30). In this chapter, it was observed, that by calculating the sum of the additivity of the compounds and the activity index, that the mortality caused by the combined compounds is 0.10 to 0.38 times lower compared to the mortality values caused by the compounds alone, therefore, an antagonistic effect. In the third chapter, larvae were subjected to sub-lethal levels of the compounds, for this a randomized experimental system was used, with three replicates per treatment. In addition to a control treatment (no total ammonia or nitrite added), concentrations of 4, 8, and 16 mg.L<sup>-1</sup> for total ammonia and 0.75, 1.5, and 3 mg.L<sup>-1</sup> for nitrite were tested. These values correspond to half the safe levels, the safe level, and twice the safe level for each compound calculated for 96 hours in Chapter I. It was possible to observe that the chronic toxicity levels of total ammonia and nitrite did not significantly influence the mortality values, however, when exposed to twice the safety level of the compounds evaluated, a delay in larval development of *M. amazonicum* was observed. The results of the studies performed pointed out the importance of determining safe levels of nitrogen compounds during larviculture of *M. amazonicum* providing valuable information for the production of young forms in quantity and quality.

Keywords: Hatchery Systems. Zoea. Acute effect. Chronic effect. Nitrogen compounds.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	7
CAPÍTULO I .....	9
CAPÍTULO II .....	25
CAPÍTULO III .....	40
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	53
REFERÊNCIAS .....	54
APÊNDICE .....	57

## INTRODUÇÃO GERAL

O camarão-da-amazônia (*Macrobrachium amazonicum*) é uma das inúmeras espécies de camarões nativos do gênero *Macrobrachium* no Brasil, essa espécie vem sendo foco de estudos devido à sua importância ecológica e econômica, sendo um dos principais recursos explorados na região Norte e Nordeste do Brasil (Moraes-Valenti e Valenti, 2010). A espécie pertence à família Palaemonidae e apresenta ampla distribuição em rios, lagos e planícies aluviais em regiões tropicais e subtropicais da América do Sul, ocorrendo das Guianas até a Argentina. No Brasil, a ocorrência de *M. amazonicum* foi registrada em diversas regiões e ambientes, inclusive na região sul com registros na planície de inundação do alto rio Paraná, onde contribui para a dieta de inúmeras espécies de peixes, além de ser considerada uma oportunidade de exploração sustentável para região (Maciel e Valenti, 2009).

Devido sua importância vários estudos para desenvolvimento da espécie estão sendo realizados para viabilizar sua produção em cativeiro (Meireles et al., 2013; Rodrigues et al., 2019; Dantas et al., 2020; Dantas et al., 2022). Entretanto, ainda são necessários estudos que gerem informações para compreender melhor a biologia da espécie que se encontra à mercê das variações na qualidade de água (Boyd, 2020) e assim obter informações para a manutenção deste camarão em sistemas de produção.

Nos sistemas de produção de camarões, requisitos básicos devem ser atendidos em relação ao manejo alimentar e ao monitoramento e controle da qualidade de água. Esses requisitos, quando não atendidos, podem ser considerados agentes estressores, podendo ocasionar desde crescimento reduzido até mortalidade, a exemplo dos compostos nitrogenados (De Queiroz, 2013).

Dentre os compostos nitrogenados, a amônia é comprovadamente tóxica, devido à capacidade de difusão pelas brânquias, podendo ocasionar estresse e reduzir a habilidade na manutenção da homeostase (Mugnier e Justons, 2004; Romano e Zeng, 2013; Zhang et al., 2015), influenciando no crescimento, alimentação, sobrevivência e suscetibilidade a doenças e parasitas em camarões e outros organismos aquáticos (Kir et al., 2004; Mugnier e Justons, 2004). Da mesma forma, altos níveis de nitrito na água são potenciais fatores desencadeadores de

estresse para organismos aquáticos (Tomasso, 1994; Ciji e Akhtar, 2020). Estudos sobre o efeito do nitrito para camarões mostraram que, em concentrações elevadas, o nitrito pode retardar o crescimento, ocasionar a formação de metahemocianina, diminuindo o nível de oxihemocianina, impedindo a função respiratória do metabolismo, causando hipóxia nos tecidos ou ainda podendo afetar o equilíbrio ácido-base e a excreção de amônia, diminuindo a capacidade imunológica do animal, aumentando a suscetibilidade à infecção por bactérias e até mesmo causando a morte em casos extremos (Chen e Cheng, 1995; Xian *et al.*, 2011).

Para avaliação de efeitos tóxicos de compostos químicos, estudos usando testes de letalidade (CL<sub>50</sub>) são recomendados (Zagatto e Bertolotti 2008). A espécie *Macrobrachium amazonicum* já foi alvo de estudos tanto para amônia total quanto para nitrito, quando foram realizados testes com pós-larvas, juvenis e adultos dessa espécie (Dutra *et al.* 2016a; Dutra *et al.* 2016b). Contudo, ainda é preciso gerar informações sobre a toxicidade destes compostos durante a fase larval desta espécie (Valenti *et al.*, 2010).

Tais informações são importantes pois é através da larvicultura que serão obtidas as formas jovens que são fundamentais para o desenvolvimento dos cultivos. Aliado a isso estão os altos índices de captura (Moraes-Valenti e Valenti, 2010) desta espécie que podem acabar causando impactos a sua população natural e levar a níveis perigosos quanto a extinção da espécie, assim como acontece com o *Macrobrachium carcinus* (Gomes *et al.*, 2016), desta forma, informações que subsidiem a produção de pós-larvas e a criação em cativeiro destes camarões são de fundamental importância.

## CAPÍTULO I

## **Efeito agudo de amônia total e nitrito para larvas do camarão-da-amazônia**

### ***Macrobrachium amazonicum***

Toxicidade aguda de amônia total e nitrito para larvas de *Macrobrachium amazonicum*

### **RESUMO**

Conhecer os agentes tóxicos e seus efeitos, é fundamental para a proteção da vida aquática e para avaliação do impacto que esses agentes causam à biota. Entre estes agentes, a amônia total e o nitrito ocorrem naturalmente em ambientes aquáticos e podem ser perigosos em sistemas de produção. Desta forma, o objetivo neste estudo foi encontrar a Concentração Letal mediana (CL<sub>50</sub>) para cada período de 24 horas em um total de 96 horas de exposição e definir um nível de segurança para larvas de *Macrobrachium amazonicum* expostas ao efeito agudo de amônia total e nitrito. Para isso, testes individuais de amônia total e nitrito foram realizados em um sistema experimental randomizado, com quatro réplicas por tratamento. Os tratamentos com amônia total continham as seguintes concentrações (0, 10, 20, 40, 80 e 160 mg.L<sup>-1</sup>), enquanto que as concentrações de nitrito avaliadas foram (0, 5, 10, 15, 20, 40, 80 e 160 mg.L<sup>-1</sup>). Os experimentos foram conduzidos em unidades experimentais com volume útil de 1000 ml de água, aeração forçada constante e fotoperíodo 12:12 (claro: escuro), em sala climatizada. A água utilizada continha salinidade de 12 g/L e foram estocadas 20 larvas por unidade experimental. Os animais utilizados foram larvas de *M. amazonicum* no estágio de Zoea V, foi fornecida alimentação com *nauplius* de *Artemia* recém eclodidos (20 a 40 *nauplius* por larva) diariamente. As concentrações foram obtidas à partir de soluções estoque, para amônia utilizou-se Cloreto de amônio P.A em uma concentração de 1000 mg.L<sup>-1</sup>, enquanto que para nitrito foi utilizado Nitrito de Sódio P.A em uma concentração de 1000 mg.L<sup>-1</sup>. As CL<sub>50</sub>, foram calculadas utilizando o método estatístico Probit entre 24, 48, 72 e 96 horas e o nível de segurança multiplicando cada valor de CL<sub>50</sub> por 0,1. As variáveis de qualidade de água foram avaliadas, diariamente, para oxigênio dissolvido, temperatura, pH e salinidade. Os valores de CL<sub>50</sub> de amônia total foram de 119,51; 94,25; 85,99 e 80,68 mg.L<sup>-1</sup> para 24, 48, 72 e 96 horas, respectivamente. Desta forma foram calculados os valores dos níveis de segurança para 24, 48, 72 e 96 horas que foram 11,95; 9,42; 8,59 e 8,06 mg.L<sup>-1</sup>. Para nitrito os valores de CL<sub>50</sub> foram de 96,55; 28,19; 15,58 e 15,36 mg.L<sup>-1</sup> para 24, 48 72 e 96 horas. Os valores dos níveis de segurança foram 9,65; 2,81; 1,55 e 1,53 mg.L<sup>-1</sup> para 24, 48, 72 e 96 horas. Os valores encontrados serão importantes para promover maior segurança e melhores resultados na produção de pós-larvas da espécie.

**Palavras-chave:** Compostos Nitrogenados, Larvicultura, Carcinicultura.

## INTRODUÇÃO

No cenário da cadeia produtiva brasileira, a criação de camarão de água-doce é baseada na espécie exótica *Macrobrachium rosenbergii*, contudo, o uso de espécies exóticas em sistemas de produção vai de encontro à alguns preceitos de sustentabilidade (Valenti et al., 2021), principalmente em sistemas onde há pouco ou nenhum controle sobre o escape, o que tem representado altos riscos ambientais (Silva et al. 2020). Das espécies nativas brasileiras, que têm sido objeto de estudo para a geração de informações que melhorem as respostas de crescimento, desempenho produtivo e viabilidade da prole, a que se destaca é a *Macrobrachium amazonicum* (Moraes-Valenti e Valenti 2010; Rodrigues et al. 2019, Dantas et al. 2020). A espécie também já foi alvo de estudos quanto à toxicidade aguda de amônia e nitrito, quando foram realizados testes com pós-larvas, juvenis e adultos dessa espécie (Dutra et al. 2016a; Dutra et al. 2016b) contudo, ainda é necessário gerar informações sobre a fase larval.

Estudos sobre a toxicidade de compostos nitrogenados com ênfase na fase larval já foram realizados para outras espécies do gênero, como o trabalho de Gomes et al., (2016) realizado com *Macrobrachium carcinus*; *Macrobrachium rosenbergii* também foi alvo dos estudos realizados por Armstrong et al., (1976) e Armstrong et al., (1978); já Figueroa-Lucero et al., (2012) realizaram testes para *Macrobrachium tenellum*. Além das espécies do gênero *Macrobrachium*, estudos em fases larvais também foram realizados para outras espécies como para *Penaeus paulensis*, *Penaeus japonicus* e *Eriocheir sinensis*, (Ostrensky and Wasielesky, 1995; Lin et al., 1993; Zhao et al., 1997).

Há uma preocupação com relação à qualidade de água em sistemas de larvicultura, devido ao acúmulo de compostos nitrogenados oriundos do metabolismo larval, dos nauplius de *Artemia*, da decomposição bacteriana de restos de alimento, fezes e organismos mortos (Valenti et al., 2010). O acúmulo de substâncias tóxicas inorgânicas como amônia e nitrito é um dos principais problemas de qualidade da água em quaisquer sistemas aquícolas (Boyd, 2020). Dependendo das concentrações e do estágio de desenvolvimento do organismo aquático produzido, os compostos nitrogenados podem atingir níveis tóxicos, afetando o desempenho zootécnico e causando mortalidade (Brazão et al. 2022, Dutra et al. 2022).

O presente trabalho visa contribuir para o entendimento ecológico e biológico da espécie *M. amazonicum*. A determinação de níveis de CL<sub>50</sub> de amônia total e nitrito para fase larval é importante para que se compreenda a ação destes compostos na fase inicial de vida dessa espécie. A partir da CL<sub>50</sub> também será possível calcular o nível de segurança para espécie na fase larval, conforme proposto por Sprague (1971). Além disso, um maior conhecimento sobre a toxicidade da amônia total e do nitrito nesta fase é fundamental para a produção de pós-larvas que são as formas jovens utilizadas no início da fase de produção em cativeiro.

O objetivo neste estudo foi encontrar a Concentração Letal mediana (CL<sub>50</sub>) para cada período de 24 horas em um total de 96 horas de exposição e definir um nível de segurança para larvas de *M. amazonicum* expostas ao efeito agudo de amônia total e nitrito.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Os reprodutores de *M. amazonicum* foram fornecidos pelo Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) de Jaboticabal, SP, Brasil, estes animais são originários de uma população do nordeste do Pará, Brasil (01°14'30"S e 48°19'52"W) em 2001 (Mantoan et al., 2021). Após um período de aclimação nos tanques de reprodução do Laboratório de Carcinicultura, no Núcleo de Pesquisas e Desenvolvimento em Aquicultura Sustentável (LABCAR – NPDA), fêmeas ovígeras foram selecionadas e aclimatadas em um tanque de eclosão. Após a eclosão em água com salinidade a 4 ppt, as larvas foram transferidas para tanques de larvicultura, onde novamente foram aclimatadas a uma salinidade de 12 ppt. As larvas foram mantidas e alimentadas nesse sistema até atingirem o estágio de desenvolvimento larval de zoea V, segundo a classificação proposta por Guest (1979).

No estágio larval de zoea V, testes individuais de toxicidade aguda de amônia total e nitrito foram realizados. Para realização dos testes foi utilizado um sistema experimental randomizado, com quatro réplicas por tratamento. Os tratamentos de amônia total continham as seguintes concentrações (0, 10, 20, 40, 80 e 160 mg.L<sup>-1</sup>). Enquanto que as concentrações utilizadas para nitrito foram (0, 5, 10, 15, 20, 40, 80 e 160 mg.L<sup>-1</sup>). Os valores das concentrações foram baseados no estudo de (Gomes et al., 2016), para *M. carcinus*.

Para cada unidade experimental foram selecionados e transferidos 20 animais, as unidades eram constituídas de potes plásticos contendo 0,5 L de água e salinidade 12 ppt com aeração constante. Após o povoamento foram acrescentados mais 0,5 L de água nas unidades experimentais, sendo que cada nova adição consistiu em uma diferente concentração de amônia ou nitrito, oriunda de solução padrão. Para amônia utilizou-se Cloreto de amônio P.A na concentração de 1000 mg.L<sup>-1</sup>, enquanto que para nitrito foi utilizado Nitrito de Sódio P.A na concentração de 1000 mg.L<sup>-1</sup> com o objetivo de chegar às concentrações testadas em cada tratamento.

Após o início do experimento, as larvas foram contadas a cada 24 horas e durante esse processo, as que se encontravam mortas foram retiradas e descartadas. O critério para avaliação da mortalidade em cada unidade experimental, foi a ausência de resposta motora a partir de estímulos mecânicos com pipeta plástica de Pasteur. Os registros ocorreram em 24, 48, 72 e 96 horas após a exposição às crescentes concentrações de amônia e nitrito. As larvas foram alimentadas diariamente com náuplios de *Artemia sp.* recém eclodidos na proporção de 20 a 40 náuplios/larva. Foi utilizado um fotoperíodo de 12:12 horas em sala climatizada. Os parâmetros de qualidade de água como oxigênio dissolvido e temperatura (HANNA HI9146) e pH (LUCAMEDA LUCA-210) foram aferidos diariamente. A determinação das concentrações de amônia total e nitrito foram realizadas a partir de amostras coletadas no início e no final do experimento. A amônia total foi avaliada pelo método de Koroleff (1976) e nitrito foi analisado pelo método de Reação de Griess (Baumgarten, 1996). O controle da salinidade dos tanques de reprodução até a realização do experimento foi feito com auxílio de Refratômetro Analógico (LORBEN 211).

A CL<sub>50</sub> e os intervalos de confiança (95%), foram calculados utilizando o método Probit com um software de licença livre (Jamovi) para cada período de 24 horas das 96 horas experimentais. O nível de segurança foi estimado baseado em Sprague (1971), multiplicando cada valor de CL<sub>50</sub> por 0,1. Os dados de mortalidade passaram pela verificação dos pressupostos de normalidade e homogeneidade por meio dos testes de Shapiro & Wilks e Levene (Sokal 2012), respectivamente. Após a verificação dessas premissas, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

## RESULTADOS

Os dados das variáveis de qualidade de água foram agrupados por tratamento para obtenção das médias e desvio padrão e são apresentados nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1 – Média e desvio padrão das variáveis de qualidade de água nas unidades experimentais contendo larvas de *Macrobrachium amazonicum* submetidos a diferentes concentrações de amônia total em 24, 48, 72 e 96 horas.

Tratamento	Amônia (mg.L <sup>-1</sup> )	Nitrito (mg.L <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	Oxigênio dissolvido (mg/ L)	pH
Valor Esperado	Valor de Leitura				
0A	0,4 ± 0,2	0,1 ± 0,0	28,2 ± 0,2	7,2 ± 0,2	8,2 ± 0,1
10A	10,3 ± 0,9	0,1 ± 0,1	28,0 ± 0,2	7,2 ± 0,2	8,1 ± 0,1
20A	19,3 ± 3,0	0,1 ± 0,0	28,1 ± 0,2	7,2 ± 0,2	8,1 ± 0,1
40A	42,2 ± 9,1	0,1 ± 0,1	28,2 ± 0,2	7,2 ± 0,2	8,0 ± 0,1
80A	81,9 ± 16,0	0,2 ± 0,1	28,3 ± 0,1	7,3 ± 0,7	7,9 ± 0,1
160A	197,9 ± 20,9	0,1 ± 0,1	28,0 ± 0,1	7,4 ± 0,1	8,0 ± 0,1
Valores referência*			28 a 30	≥ 6	~ 8

\*Valores recomendados por Moraes-Valenti e Valenti (2010)

Fonte: O autor (2022)

Tabela 2 – Média e desvio padrão das variáveis de qualidade de água nas unidades experimentais contendo larvas de *Macrobrachium amazonicum* submetidos a diferentes concentrações de nitrito em 24, 48, 72 e 96 horas.

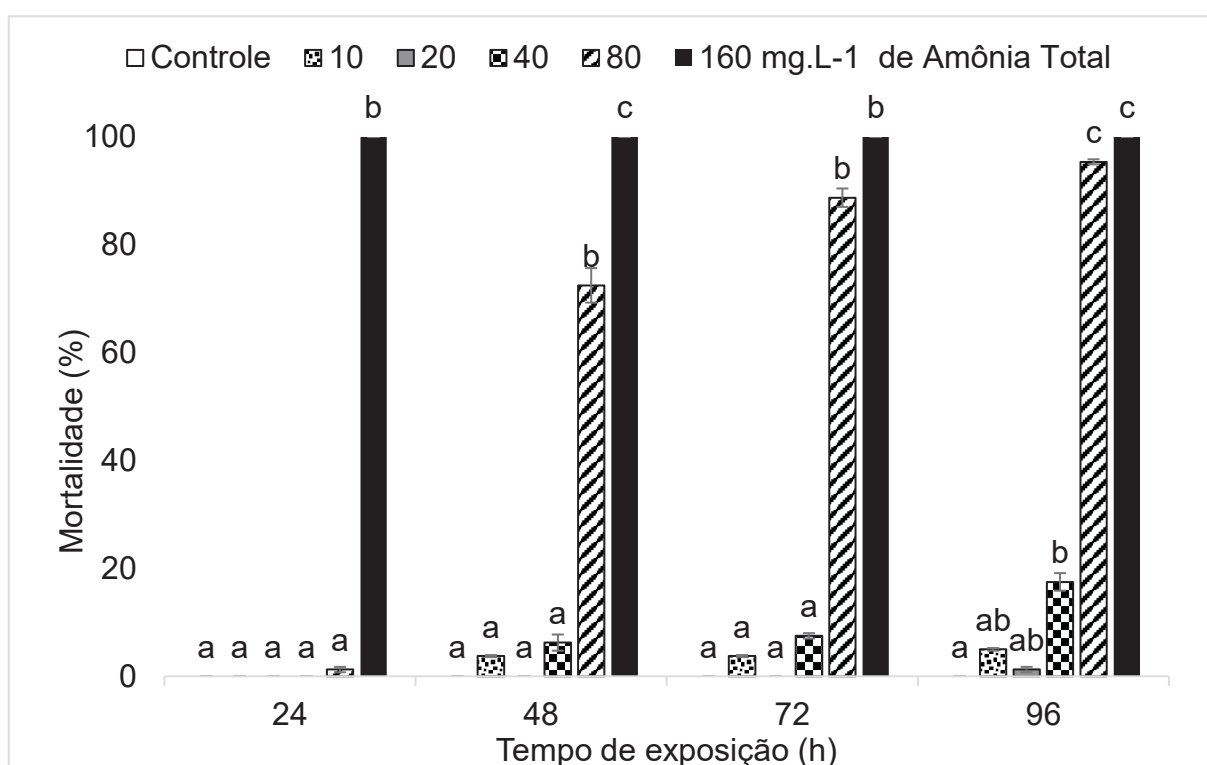
Tratamento	Nitrito (mg.L <sup>-1</sup> ) Valor de Leitura	Amônia (mg.L <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	Oxigênio dissolvido (mg/ L)	pH
0N	0,3 ± 0,0	0,0 ± 0,0	28,1 ± 0,1	6,5 ± 0,2	7,8 ± 0,2
5N	6,3 ± 0,0	0,0 ± 0,0	28,2 ± 0,6	6,3 ± 0,2	8,0 ± 0,1
10N	9,9 ± 0,0	0,0 ± 0,0	28,2 ± 0,3	6,5 ± 0,3	8,0 ± 0,1
15N	17,9 ± 0,0	0,0 ± 0,0	28,2 ± 0,6	6,2 ± 0,2	8,0 ± 0,1
20N	19,8 ± 0,2	0,0 ± 0,0	28,1 ± 0,1	6,7 ± 0,2	8,0 ± 0,1
40N	41,2 ± 0,2	0,0 ± 0,0	28,1 ± 0,1	6,7 ± 0,2	8,0 ± 0,1
80N	81,2 ± 0,3	0,0 ± 0,0	28,0 ± 0,1	6,6 ± 0,3	8,0 ± 0,1
160N	163,3 ± 0,5	0,0 ± 0,0	28,1 ± 0,1	6,6 ± 0,2	8,0 ± 0,0
Valores referência*			28 a 30	≥ 6	~ 8

\*Valores recomendados por Moraes-Valenti e Valenti (2010)

Fonte: O autor (2022)

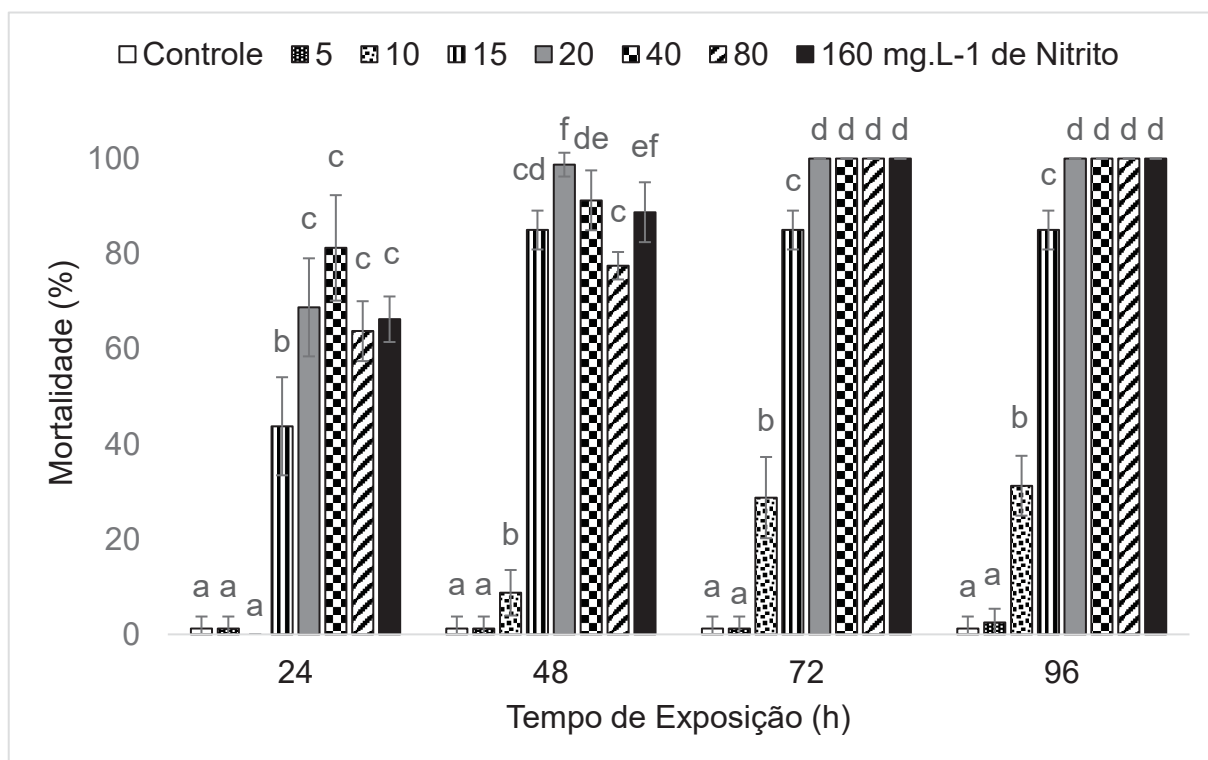
As mortalidades foram observadas durante as 96h de experimento, observou-se um aumento conforme o aumento das concentrações de amônia total e nitrito e do tempo de exposição como apresentados nas Figuras 1 e 2.

Figura 1 – Média e desvio padrão da mortalidade acumulativa de larvas de *Macrobrachium amazonicum* submetidos a diferentes níveis de exposição de amônia total em 24, 48, 72 e 96 horas. Letras sobrescritas diferentes nas colunas de um mesmo período indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).



Fonte: O autor (2022)

Figura 2 – Média e desvio padrão da mortalidade acumulativa de larvas de *Macrobrachium amazonicum* submetidos a diferentes níveis de exposição de nitrito em 24, 48, 72 e 96 horas. Letras sobrescritas diferentes nas colunas de um mesmo período indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).



Fonte: O autor (2022)

A partir dos valores de mortalidade, foi possível calcular os valores de CL<sub>50</sub>, intervalos de confiança e níveis de segurança, como apresentados nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 – Concentração letal mediana (CL<sub>50</sub>), intervalo de confiança e nível de segurança para larvas de *Macrobrachium amazonicum* submetidos a diferentes níveis de exposição de amônia total em 24, 48, 72 e 96 horas.

Horas	CL <sub>50</sub> (mg.L <sup>-1</sup> de Amônia)	Intervalo de Confiança CL <sub>50</sub> (mg.L <sup>-1</sup> de Amônia)	Nível de segurança CL <sub>50</sub> (mg.L <sup>-1</sup> de Amônia)
24	119,51	109,05 – 129,97	11,95
48	94,25	86,76 – 101,74	9,42
72	85,99	76,39 – 95,58	8,59
96	80,68	70,87 – 90,92	8,06

Fonte: O autor (2022)

Tabela 4 – Concentração letal mediana (CL<sub>50</sub>), intervalo de confiança e nível de segurança para larvas de *Macrobrachium amazonicum* submetidos a diferentes níveis de exposição de nitrito em 24, 48, 72 e 96 horas.

Horas	CL <sub>50</sub> (mg.L <sup>-1</sup> de Nitrito)	Intervalo de Confiança CL <sub>50</sub> (mg.L <sup>-1</sup> de Nitrito)	Nível de segurança CL <sub>50</sub> (mg.L <sup>-1</sup> de Nitrito)
24	96,55	94,60 – 98,50	9,65
48	28,19	19,86 – 36,51	2,81
72	15,58	13,09 – 18,07	1,55
96	15,36	12,89 – 17,84	1,53

Fonte: O autor (2022)

Com a obtenção dos valores de CL<sub>50</sub> para 96 horas foi realizado um comparativo entre as diferentes fases de vida da espécie, como apresentado na tabela 5.

Tabela 5 – Concentração letal mediana (CL<sub>50</sub>) e nível de segurança para diferentes fases de vida de *Macrobrachium amazonicum* em 96 horas.

<b>Composto e estágio de vida</b>	<b>CL<sub>50</sub></b> (mg.L <sup>-1</sup> )	<b>Nível de segurança</b> (mg.L <sup>-1</sup> )	<b>Referência</b>
<b>Amônia Total</b>			
Larva	80,68	8,06	Este estudo
Pós-larva	21,14	2,11	Dutra et al. 2016a
Juvenil	21,65	2,16	Dutra et al. 2016a
Adulto	36,59	3,65	Dutra et al. 2016a
<b>Nitrito</b>			
Larva	15,36	1,53	Este estudo
Pós-larva	1,49	0,14	Dutra et al. 2016b
Juvenil	2,36	0,23	Dutra et al. 2016b
Adulto	2,34	0,23	Dutra et al. 2016b

Fonte: O autor (2022)

## DISCUSSÃO

As concentrações de amônia total e nitrito que foram utilizadas, ficaram dentro dos valores esperados após a diluição das soluções estoques preparadas para os experimentos. Para ambos os experimentos, os valores médios de temperatura, oxigênio dissolvido e pH ficaram dentro do recomendado para fase de larvicultura de *M. amazonicum* segundo Moraes-Valenti e Valenti (2010).

Uma sobrevivência de 70% a 80% é esperada para larvicultura da espécie (Moraes-Valenti e Valenti, 2010). Em nossos experimentos no estágio larval de Zoea V, a taxa de mortalidade aumentou significativamente ( $P < 0,05$ ) com o aumento das concentrações testadas. No experimento com amônia total, para o tratamento controle, não foi observada mortalidade em 96 horas. Foi observado que as larvas de *M. amazonicum* expostas às concentrações de 10, 20 e 40 mg.L<sup>-1</sup> de amônia total apresentaram mortalidade de 5%, 1,25% e 17,5%, respectivamente. Esses valores de mortalidade podem ser considerados baixos de acordo com Moraes-Valenti e Valenti

(2010). No tratamento de 80 mg.L<sup>-1</sup> foi observado que as mortes aconteceram gradativamente até chegar em um total de 93,75% ao fim das 96 horas experimentais. A maior mortalidade (100%) ocorreu na concentração de 160 mg/L, para essa concentração o total de mortalidade ocorreu dentro de 24 horas. Já para nitrito, no tratamento controle foi observada uma mortalidade de 1,25% dentro das 96 horas. Para 5 mg.L<sup>-1</sup> de nitrito a mortalidade foi de 2,5%, nesse caso, como no controle, os valores foram considerados normais (Moraes-Valenti e Valenti, 2010). Quando desafiados a 10 e 15 mg.L<sup>-1</sup>, a mortalidade observada foi de 31,25% e 85%, respectivamente. A partir de 20 mg.L<sup>-1</sup>, todos os tratamentos obtiveram 100% de mortalidade ainda em 72 horas de experimento.

No presente trabalho, para ambos os compostos, foi observado que a CL<sub>50</sub> diminuiu com o tempo de exposição, pois como os animais ficam mais tempo expostos aos compostos, é necessária uma menor concentração do agente tóxico para levar a mortalidade dos organismos. O mesmo foi observado por Gomes *et al.*, (2016) que encontrou uma redução dos valores de CL<sub>50</sub> com o tempo de exposição para larvas de *M. carcinus*. Além disso, CL<sub>50</sub> de 96 horas, quando comparada com outras fases de vida da espécie, foi bem mais alta, tal resultado deve-se, provavelmente, a salinidade existente em fase de larvicultura. Essa influência da salinidade na toxicidade já foi descrita para outras espécies, tanto para amônia como para nitrito (Romano e Zeng, 2013). Lin e Chen, (2001) utilizaram 3 diferentes níveis de salinidade para juvenis de *Litopenaeus vannamei* e observaram que com o decréscimo da salinidade de 35 ‰ para 15 ‰ houve um aumento na suscetibilidade da amônia. Resultado semelhante com juvenis de *Litopenaeus schmitti* foi encontrado por Barbieri, (2010). Chen e Lin, (1991), encontraram um aumento superior a 20% na toxicidade de nitrito para juvenis de *Penaeus penicillatus* quando desafiados a um decréscimo de salinidade de 34 para 25 ppt. Do mesmo modo, para juvenis de *L. vannamei*, houve um decréscimo da CL<sub>50</sub> de nitrito quando desafiados a reduções de níveis de salinidade, Lin e Chen, (2003).

Para as larvas de *M. amazonicum*, a estimativa de 96 horas de CL<sub>50</sub> de amônia total para Zoea V foi de 80,68 mg.L<sup>-1</sup> maior do que foi estimado para *M. carcinus* (Gomes *et al.*, 2016), sendo a CL<sub>50</sub> de 96 h de 13,84 mg.L<sup>-1</sup>, superior também ao que foi estimado para *M. rosenbergii*, onde a CL<sub>50</sub> de 24 horas foi de 89,5 mg.L<sup>-1</sup> (Armstrong *et al.*, 1978), neste estudo a CL<sub>50</sub> de 24 horas foi de 119,51 mg.L<sup>-1</sup>. Para *Macrobrachium tenellum*, a CL<sub>50</sub> encontrada foi de 24,73 e 13,07 mg.L<sup>-1</sup> para 24 e 72 horas, respectivamente (Figueroa-Lucero *et al.*, 2012). Desse modo, podemos

considerar as larvas de *M. amazonicum* mais resistentes quando expostas as concentrações letais de amônia total durante 96 h. O mesmo cenário é observado para nitrito, quando comparado com outras espécies do gênero. Nesse estudo a CL<sub>50</sub> para *M. amazonicum* foi de 15,36 mg/L em 96 horas, enquanto *M. rosenbergii* e *M. carcinus*, obtiveram valores de 8,6 e 9,37 mg/L em 96 horas. Embora a CL<sub>50</sub> seja tradicionalmente utilizada para o monitoramento das concentrações de compostos tóxicos à organismos aquáticos (Romano e Zeng, 2013), sua aplicação é pouco recomendada para atividades em que se busca o máximo de sobrevivência, como o caso da larvicultura de camarões (Moraes-Valenti e Valenti, 2010). Por esse motivo, utiliza-se como complemento aos valores de CL<sub>50</sub> o nível de segurança proposto por Sprague (1971). Para o presente estudo, os níveis de segurança de amônia total para 24, 48, 72 e 96 horas foram 11,95; 9,42; 8,59 e 8,06 mg.L<sup>-1</sup>. Enquanto que para nitrito os valores dos níveis de segurança foram 9,65; 2,81; 1,55 e 1,53 para 24, 48, 72 e 96 horas.

Deste modo, considerando a resistência de *M. amazonicum* a toxicidade aguda de amônia total e nitrito, pode-se dizer que a espécie parece ser bastante promissora perante os resultados aqui obtidos. O monitoramento da qualidade de água com níveis de produtos nitrogenados durante a produção de larvas de *M. amazonicum* se faz necessário, assim como as boas práticas de manejo que tendem a diminuir o acúmulo desses compostos durante a produção, especificamente durante os primeiros estágios larvais.

## CONCLUSÃO

Os valores de CL<sub>50</sub> de amônia total neste estudo foram de 119,51; 94,25; 85,99 e 80,68 mg.L<sup>-1</sup> para 24, 48, 72 e 96 horas , respectivamente. Os níveis de segurança para 24, 48, 72 e 96 horas que foram 11,95; 9,42; 8,59 e 8,06 mg.L<sup>-1</sup>. Para nitrito os valores de CL<sub>50</sub> foram de 96,55; 28,19; 15,58 e 15,36 para 24, 48 72 e 96 horas. Os valores dos níveis de segurança foram 9,65; 2,81; 1,55 e 1,53 para 24, 48, 72 e 96 horas. Os valores encontrados serão importantes para promover maior segurança e melhores resultados na produção de pós-larvas da espécie.

## REFERÊNCIAS

- Armstrong, D. A., Stephenson, M. J., & Knight, A. W., 1976. Acute toxicity of nitrite to larvae of the giant Malaysian prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 9, 39-46. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(76\)90046-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(76)90046-6)
- Armstrong, D. A., Chippendale, D., Knight, A. W., & Colt, J. E., 1978. Interaction of ionized and unionized ammonia on short-term survival and growth of prawn larvae, *Macrobrachium rosenbergh*. *The Biological Bulletin*, 154(1), 15-31. <https://doi.org/10.2307/1540771>
- Baumgarten, M.G.Z., 1996. Manual de análises em oceanografia química. Furg, Rio Grande, p. 132.
- Boyd, C. E., 2020. *Water quality: an introduction*. Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-23335-8>
- Barbieri, E. (2010). Acute toxicity of ammonia in white shrimp (*Litopenaeus schmitti*)(Burkenroad, 1936, Crustacea) at different salinity levels. *Aquaculture*, 306(1-4), 329-333. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.06.009>
- Brazão, C. C., Kracizy, R. O., Dutra, F. M., Rodrigues, M. C. G., & Ballester, E. L. C., 2022. Combined effect of ammonia and nitrite for *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) and *Macrobrachium rosenbergii* (De man, 1879) post-larvae. *Aquaculture*, 551, 737880. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737880>
- Chen, J. C. and Lin, C. Y., 1991. Lethal effects of ammonia and nitrite on *Penaeus pencillatus* juveniles at two salinity levels. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100C: 477–482. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(91\)90026-P](https://doi.org/10.1016/0742-8413(91)90026-P)
- Dantas D.P., Flickinger D.L., Costa G.A., Batlouni S.R., Moraes-Valenti P., Valenti W.C., 2020. Technical feasibility of integrating Amazon River prawn culture during the first phase of tambaqui grow-out in stagnant ponds, using nutrient-rich water. *Aquaculture* 516:734611. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734611>
- Dutra, F. M., Forneck, S. C., Brazão, C. C., Freire, C. A., & Ballester, E. L. C., 2016a. Acute toxicity of ammonia to various life stages of the Amazon river prawn, *Macrobrachium amazonicum*, Heller, 1862. *Aquaculture*, 453, 104-109. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.038>
- Dutra, F. M., Freire, C. A., Vaz dos Santos, A. M., Forneck, S. C., Brazão, C. C., & Ballester, E. L. C., 2016b. Acute toxicity of nitrite to various life stages of the Amazon river prawn, *Macrobrachium*

*amazonicum*, Heller, 1862. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 97(5), 619-625. <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1932-2>

Dutra, F. M., Gomes, M. K. C., Furtado, P. S., Rönna, M., & Ballester, E. L. C., 2022. Effect of nitrate on the performance and welfare of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) juveniles. *Aquaculture*, 547, 737428. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737428>

Figueroa-Lucero, G., Hernández-Rubio, M. C., & Gutiérrez-Ladrón de Guevara, M. D. J., 2012. Acute toxicity of ammonia on *Macrobrachium tenellum* (Smith) larvae. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 28(2), 145-150.

Gomes Jr, R. S., de Lima, J. P. V., Cavalli, R. O., & Correia, E. D. S., 2016. Acute toxicity of ammonia and nitrite to painted river prawn, *Macrobrachium carcinus*, larvae. *Journal of the World Aquaculture Society*, 47(2), 239-247. <https://doi.org/10.1111/jwas.12258>

Guest, W. C., 1979. Laboratory life history of the palaemonid shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Heller)(Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana*, 37(2), 141-152.

F. Koroleff, 1976. Determination of nutrients K. Grasshoff (Ed.), *Methods of Seawater Analysis*, Verlag Chemie Weinheim, pp. 117-181

Lin, H. P., Thuet, P., Trilles, J. P., Mounet-Guillaume, R., & Charmantier, G., 1993. Effects of ammonia on survival and osmoregulation of various development stages of the shrimp *Penaeus japonicus*. *Marine Biology*, 117(4), 591-598.

Lin, Y. C., & Chen, J. C. (2001). Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 259(1), 109-119. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(01\)00227-1](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(01)00227-1)

Lin, Y. C., & Chen, J. C. (2003). Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. *Aquaculture*, 224(1-4), 193-201. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00220-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00220-5)

Macêdo, J.A.B., 2005. *Métodos Laboratoriais de Análises Físico-químicas & Microbiológicas*. JAB Macêdo.

Mantoan, P., Ballester, E., Ramaglia, A.C., Augusto, A., 2021. Diet containing 35% crude protein improves energy balance, growth, and feed conversion in the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*. *Aquacult. Rep.* 21, 100962 <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100962>.

Moraes-Valenti P, Valenti WC, 2010. Culture of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*. In: New MB, Valenti WC, Tidwell JH, D'Abramo LR, Kutty MN (eds) *Freshwater prawns: biology and farming*. Wiley-Blackwell, Oxford, pp 485–501

Ostrensky, A., & Wasielesky Jr, W., 1995. Acute toxicity of ammonia to various life stages of the São Paulo shrimp, *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967. *Aquaculture*, 132(3-4), 339-347. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00343-M](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00343-M)

Rodrigues CG, Garcia BF, Verdegem M, Santos MR, Amorim RV, Valenti WC, 2019. Integrated culture of Nile tilapia and Amazon River prawn in stagnant ponds, using nutrient-rich water and substrates. *Aquaculture* 503:111–117. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.073>

Romano, N., & Zeng, C., 2013. Toxic effects of ammonia, nitrite, and nitrate to decapod crustaceans: a review on factors influencing their toxicity, physiological consequences, and coping mechanisms. *Reviews in Fisheries Science*, 21(1), 1-21. <https://doi.org/10.1080/10641262.2012.753404>

Silva, T. A. D., Ballester, E. L. C., & Cunico, A. M, 2020. First records of non-native species Malaysian prawn *Macrobrachium rosenbergii* (Decapoda: Palaemonidae) in an important South American hydrographic system. *Acta Limnologica Brasiliensia*, v. 32. <https://doi.org/10.1590/S2179-975X8319>

Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 2012. *Biometry: Principle and Practices of Statistics in Biological Research*, fourth ed. W.H. Freeman e Company, New York.

Sprague, J. B. (1971). Measurement of pollutant toxicity to fish—III: Sublethal effects and “safe” concentrations. *Water research*, 5(6), 245-266. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(71\)90171-0](https://doi.org/10.1016/0043-1354(71)90171-0)

Valenti, W. C., Barros, H. P., Moraes-Valenti, P., Bueno, G. W., & Cavalli, R. O, 2021. Aquaculture in Brazil: past, present and future. ***Aquaculture Reports***, v. 19, p. 100611. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100611>

Valenti W.C, Daniels, W. H, New, M. B, Correia, E. S., 2010. Hatchery Systems and Management. In: New MB, Valenti WC, Tidwell JH, D'Abramo LR, Kutty MN (eds) *Freshwater prawns: biology and farming*. Wiley-Blackwell, Oxford, pp 55–85

Zhao, J. H., Lam, T. J., & Guo, J. Y., 1997. Acute toxicity of ammonia to the early stage-larvae and juveniles of *Eriocheir sinensis* H. Milne-Edwards, 1853 (Decapoda: Grapsidae) reared in the laboratory. *Aquaculture Research*, 28(7), 517-525. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1997.00888.x>

## **CAPÍTULO II**

## **Efeito combinado de amônia total e nitrito para larvas do camarão-da-amazônia** ***Macrobrachium amazonicum***

Interação aguda de amônia total e nitrito para larvas de *Macrobrachium amazonicum*

### **RESUMO**

O objetivo no presente estudo foi calcular a Concentração Letal Mediana (CL<sub>50</sub>) do efeito combinado de amônia total e nitrito para cada período de 24 horas em um total de 96h, determinar o nível de segurança e compreender a interação destes compostos sobre larvas de *Macrobrachium amazonicum*. Foram utilizadas 1280 larvas no estágio Zoea V distribuídas em 64 unidades experimentais, com delineamento experimental casualizado, em desenho fatorial 4x4, sendo quatro concentrações de amônia total (0, 40, 80, 160 mg.L<sup>-1</sup>), quatro concentrações de nitrito (0, 7,5, 15, 30 mg.L<sup>-1</sup>) e suas combinações (40:7,5; 40:15; 40:30; 80:7,5; 80:15; 80:30; 160:7,5; 160:15; 160:30), para cada tratamento haviam quatro réplicas. Nos tratamentos com os compostos isolados foi observado um aumento nas mortalidades ao longo das 96h de experimento diretamente relacionado com o aumento na concentração dos compostos a que as larvas foram submetidas. Foi utilizado o método probit para calcular as CL<sub>50</sub> dos compostos, para amônia total os valores da CL<sub>50</sub> isolados foram de 97,48; 64,79; 61,75 e 57,01 mg.L<sup>-1</sup> para 24, 48, 72 e 96 horas. Já os valores de CL<sub>50</sub> combinados foram de 60,68; 44,28; 42,23; 40,58 mg.L<sup>-1</sup> para 24, 48, 72 e 96 horas. Desta forma, os níveis de segurança foram 9,48; 6,47; 6,17 e 5,70 mg.L<sup>-1</sup>, quando isolados, 6,06; 4,28; 4,22 e 4,05 mg.L<sup>-1</sup> quando combinados. Para nitrito os valores de CL<sub>50</sub> para 24, 48, 72 e 96 horas foram de 19,58; 12,67; 11,90 e 11,64 mg.L<sup>-1</sup> quando isolados e 9,26; 6,57; 7,43 e 7,80 mg.L<sup>-1</sup> quando combinados. Por consequência os níveis de segurança quando isolados foram de 1,95; 1,26; 1,19 mg.L<sup>-1</sup> e 1,16 e 0,92; 0,65; 0,74 e 0,78 mg.L<sup>-1</sup> quando combinados. Observou-se, por meio do cálculo da soma da aditividade dos compostos e do índice de atividade, que a mortalidade causada pelos compostos combinados é 0,10 a 0,38 vezes menor em relação aos valores de mortalidade causada pelos compostos isoladamente, portanto, um efeito antagônico. A partir dos resultados do presente estudo, podemos afirmar que as larvas de *M. amazonicum* possuem maior tolerância aos compostos combinados em relação aos compostos isoladamente.

**Palavras-chaves:** Carcinicultura; Ecotoxicologia; Compostos nitrogenados.

## INTRODUÇÃO

Embora os efeitos de amônia e nitrito sejam vastamente relatados e discutidos, em trabalhos específicos ou em revisões do tema, para uma série de espécies de crustáceos (Romano e Zeng, 2013; Zhao et al. 2020) e outros organismos com interesse em aquicultura (Tomasso, 1994; Ciji e Akhtar, 2020), poucos trabalhos abordaram os efeitos da interação destes compostos, especialmente para camarões de água doce (Zhang et al., 2015; Brazão et al., 2021, Brazão et al., 2022).

O tema da interação dos compostos é muito relevante, pois em sistemas aquáticos naturais ou nos ambientes de produção, os organismos podem estar expostos não a um único composto, mas a uma combinação dessas substâncias ao mesmo tempo. Quando isso ocorre é necessário observar o resultado desta interação, podendo ela ter um efeito antagônico, aditivo ou sinérgico (Zagatto e Bertoletti, 2008; Rand et al, 2020).

Atualmente, o Brasil conta com pelo menos 10 larviculturas comerciais de camarões de água doce que distribuem pós-larvas da espécie exótica *Macrobrachium rosenbergii* por todo país, contudo existem apenas duas que produzem pós-larvas de *Macrobrachium amazonicum* (Valenti et al., 2021). A espécie é tradicionalmente consumida nas regiões norte e nordeste do país, espera-se que o cultivo da espécie possa suprir o declínio na oferta causado pela pesca artesanal excessiva (Valenti et al., 2021). Além disso, uma série de estudos vem demonstrando sua viabilidade econômica em trabalhos de aquicultura multitrófica integrada (Rodrigues et al., 2019; Dantas et al., 2020; Dantas et al., 2022). Soma-se a isso o risco de dispersão de espécies exóticas que pode ser uma ameaça a biodiversidade (Silva et al. 2020) e a aceitação do mercado interno para o consumo de espécies nativas (Pincinato e Asche, 2016).

Diversas são as estratégias e pesquisas necessárias para o sucesso da produção de espécies nativas, havendo inclusive diversos segmentos da sociedade, organizações não governamentais e instituições que vem pressionando o setor para que a produção possa ser mais sustentável (Valenti et al., 2021). Por esse motivo, compreender a interação destes compostos na fase de vida inicial da espécie é fundamental e está de acordo com os objetivos de uma carcinicultura de água doce sustentável

Desta forma o objetivo no presente estudo foi calcular a Concentração Letal Mediana (CL<sub>50</sub>) do efeito combinado de amônia total e nitrito para cada período de 24 horas

em um total de 96h, determinar o nível de segurança e compreender a interação destes compostos sobre larvas de *M. amazonicum*, durante 96 horas de exposição.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Carcinicultura, no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento em Aquicultura Sustentável (LABCAR – NPDA), da Universidade Federal do Paraná. As larvas de *M. amazonicum* utilizadas para o experimento foram oriundas de fêmeas ovígeras dos tanques de reprodução do próprio laboratório, sendo a origem destes camarões uma população do nordeste do Pará, Brasil (01°14'30"S e 48°19'52"W) em 2001 (Mantoan et al., 2021). Para execução dos ensaios, que tiveram duração de 96 horas, foram utilizadas larvas de *M. amazonicum* (n= 1280) distribuídas em 64 unidades experimentais, no estágio de Zoea V (Guest, 1979). Os animais foram alimentados diariamente com *nauplius* de artêmia recém eclodidas (20 a 40 *nauplius* por larva). As unidades experimentais eram constituídas de potes brancos de polipropileno de 1 litro de volume útil e com sistema de aeração individual para cada unidade. O ambiente experimental foi controlado com fotoperíodo 12:12 (claro:escuro) em sala climatizada 28 a 30°C. A água utilizada nos bioensaios foi oriunda do serviço de abastecimento público, devidamente desclorada e salinizada (12 ppt) com Sal Nutrazoo® (Composição: Sais de sódio, cálcio, magnésio, potássio, cloretos, brometos sulfatos, carbonatos e elementos-traços devidamente balanceados e misturados para simular o sal marinho).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x4, com concentrações isoladas de amônia total (0, 40, 80 e 160 mg.L<sup>-1</sup>) e nitrito (0, 7,5, 15 e 30 mg.L<sup>-1</sup>), e nas concentrações combinadas (40:7,5; 40:15; 40:30; 80:7,5; 80:15; 80:30; 160:7,5; 160:15; 160:30), com quatro repetições por tratamento. As concentrações utilizadas para a realização dos testes foram baseadas nas CL<sub>50</sub> de 96h determinadas no Capítulo anterior. As doses correspondem a um controle, metade da CL<sub>50</sub> de 96h de cada composto, a CL<sub>50</sub> e o dobro da CL<sub>50</sub>. As concentrações de amônia total e nitrito foram preparadas por meio de soluções estoques individuais (1.000 mg.L<sup>-1</sup> de amônia total; 250 mg.L<sup>-1</sup> de nitrito), obtidas pelas diluições de 3,819 g.L<sup>-1</sup> de cloreto de amônio P. A. (êxodo científica®) e 1,232 g.L<sup>-1</sup> de nitrito de sódio P. A. (êxodo científica®), respectivamente. As soluções estoques foram devidamente diluídas em cada unidade experimental para obtenção das concentrações desejadas.

A verificação da mortalidade foi realizada a cada 24 horas, o critério para avaliação da mortalidade foi a ausência de reação ao estímulo mecânico com Pipeta de Pasteur descartável. Ao final do experimento os dados de mortalidade foram agrupados a cada 24 horas por tratamento.

Diariamente para verificação do oxigênio dissolvido e temperatura utilizou-se um oxímetro digital portátil com sensor de temperatura (HANNA HI9146) e para a determinação do pH foi utilizado um medidor de pH de bancada (LUCAMEDA LUCA-210). A determinação das concentrações de amônia total e nitrito foram realizadas a partir de amostras coletadas no início e no final do experimento, onde a amônia total foi avaliada pelo método de Koroleff (1976) e nitrito foi analisado pelo método de Reação de Griess (Baumgarten, 1996).

A concentração letal mediana ao longo de 96 horas (CL<sub>50</sub> - 24, 48, 72 e 96h) dos compostos e os intervalos de confiança foram calculados utilizando o método probit. O nível de segurança foi estimado baseado na literatura (Sprague, 1971) multiplicando cada valor de CL<sub>50</sub> por 0.1. Após a obtenção dos valores de CL<sub>50</sub> foi feito o cálculo da soma da aditividade dos compostos (soma da toxicidade de amônia total e nitrito) e o índice de aditividade (estimativa de quantas vezes o efeito combinado é maior ou menor que o efeito isolado) conforme descrito por Zagatto e Bertolotti, (2008). O modelo expressa a soma da aditividade para diferentes substâncias (S) e o índice de aditividade (IA).

$$S = \frac{(Am)}{(Ai)} + \frac{(Bm)}{(Bi)}$$

Onde:

S é a soma da toxicidade dos compostos A e B;

Ai é a CL<sub>50</sub> do único composto A;

Am é a CL<sub>50</sub> do composto A na mistura;

Bi é a CL<sub>50</sub> de único composto B;

Bm é a CL<sub>50</sub> de composto B na mistura.

Assim, quando  $S > 1$ , o efeito da mistura é antagônico;  $S = 1$ , o efeito é aditivo;  $S < 1$ , o efeito sinérgico. Para estimar quantas vezes o efeito combinado foi maior ou menor que o efeito isolado, este foi submetido ao índice de atividade (IA).

Onde:

$S > 1$ , aplica a equação  $IA = S(-1) + 1$ ;

$S < 1$ , aplica a equação  $IA = 1/S - 1$ .

Os valores de mortalidade, agrupados em cada período, passaram pela verificação dos pressupostos de normalidade e homogeneidade por meio dos testes de Shapiro & Wilks e Levene (Sokal e Rohlf 2012), respectivamente. Após a verificação dessas premissas, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

## **RESULTADOS**

Os dados das variáveis de qualidade de água foram agrupados por tratamento para obtenção das médias e desvio padrão e são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) de variáveis de qualidade de água monitoradas durante experimento com larvas de *Macrobrachium amazonicum* expostos a diferentes níveis de concentrações de amônia total e nitrito e suas combinações, durante 96 horas.

Tratamento	Amônia total (mg.L <sup>-1</sup> )		Nitrito (mg.L <sup>-1</sup> )		Amônia Total (mg.L <sup>-1</sup> )		Nitrito (mg.L <sup>-1</sup> )		Temperatura (C°)	Oxigênio Dissolvido (mg.L <sup>-1</sup> )	pH
	Dose esperada	Dose esperada	Dose esperada	Dose esperada	Valor de leitura	Valor de leitura	Valor de leitura	Valor de leitura			
T1	0	0	0	0	0,2 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,1	28,0 $\pm$ 0,2	6,5 $\pm$ 0,2	8,1 $\pm$ 0,1		
T2	40	0	0	0	37,3 $\pm$ 2,2	0,6 $\pm$ 0,2	28,0 $\pm$ 0,2	6,4 $\pm$ 0,1	8,0 $\pm$ 0,1		
T3	80	0	0	0	80,5 $\pm$ 6,6	0,6 $\pm$ 0,1	28,0 $\pm$ 0,1	6,4 $\pm$ 0,1	8,0 $\pm$ 0,1		
T4	160	0	0	0	156,4 $\pm$ 5,5	0,5 $\pm$ 0,1	28,1 $\pm$ 0,1	6,5 $\pm$ 0,1	8,0 $\pm$ 0,1		
T5	0	7,5	7,5	7,5	0,2 $\pm$ 0,0	6,5 $\pm$ 0,7	28,0 $\pm$ 0,2	6,3 $\pm$ 0,2	8,0 $\pm$ 0,2		
T6	0	15	15	15	0,1 $\pm$ 0,0	12,7 $\pm$ 1,0	28,0 $\pm$ 0,3	6,3 $\pm$ 0,3	8,1 $\pm$ 0,1		
T7	0	30	30	30	0,1 $\pm$ 0,0	27,7 $\pm$ 3,4	28,0 $\pm$ 0,2	6,3 $\pm$ 0,2	8,0 $\pm$ 0,1		
T8	40	7,5	7,5	7,5	38,5 $\pm$ 1,1	8,5 $\pm$ 2,4	28,0 $\pm$ 0,3	6,4 $\pm$ 0,4	8,0 $\pm$ 0,1		
T9	40	15	15	15	39,1 $\pm$ 2,1	15,5 $\pm$ 2,9	28,0 $\pm$ 0,4	6,3 $\pm$ 0,3	8,0 $\pm$ 0,1		
T10	40	30	30	30	39,9 $\pm$ 1,2	29,8 $\pm$ 3,4	28,0 $\pm$ 0,4	6,3 $\pm$ 0,2	8,0 $\pm$ 0,1		
T11	80	7,5	7,5	7,5	78,7 $\pm$ 2,3	8,0 $\pm$ 2,0	28,0 $\pm$ 0,2	6,3 $\pm$ 0,3	8,0 $\pm$ 0,1		
T12	80	15	15	15	79,1 $\pm$ 2,3	15,2 $\pm$ 3,0	28,0 $\pm$ 0,6	6,1 $\pm$ 0,4	8,0 $\pm$ 0,1		
T13	80	30	30	30	79,9 $\pm$ 1,4	30,6 $\pm$ 4,3	28,0 $\pm$ 0,3	6,1 $\pm$ 0,4	8,0 $\pm$ 0,1		
T14	160	7,5	7,5	7,5	160,4 $\pm$ 7,7	8,3 $\pm$ 1,6	28,0 $\pm$ 0,1	6,5 $\pm$ 0,1	8,0 $\pm$ 0,1		
T15	160	15	15	15	161,0 $\pm$ 6,2	15,2 $\pm$ 2,6	28,1 $\pm$ 0,5	6,3 $\pm$ 0,1	8,0 $\pm$ 0,0		
T16	160	30	30	30	163,8 $\pm$ 3,6	30,1 $\pm$ 2,8	28,1 $\pm$ 0,2	6,4 $\pm$ 0,1	8,0 $\pm$ 0,1		
<b>Valores Referência</b>											
							28 a 30*	$\geq 6^*$	$\sim 8^*$		

\* Valores recomendados por Moraes-Valenti e Valenti (2010); Fonte: O autor (2022)

As mortalidades foram observadas durante as 96h de experimento, onde registrou-se um aumento nos tratamentos isolados conforme o aumento das concentrações dos compostos avaliados. Nos tratamentos com os compostos combinados foi atingida mortalidade de 100% ao longo das 96h, como indicado na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) de mortalidade (%) para larvas de *Macrobrachium amazonicum* expostas a diferentes concentrações de amônia total e nitrito em efeito isolado e combinado em período de 24, 48, 72 e 96 horas.

Tratamento	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
(0A-0N)	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	2,50 $\pm$ 5,00 <sup>a</sup>	3,75 $\pm$ 7,50 <sup>a</sup>	6,25 $\pm$ 9,46 <sup>a</sup>
(40A-0N)	1,25 $\pm$ 2,50 <sup>a</sup>	8,75 $\pm$ 6,29 <sup>a</sup>	15,00 $\pm$ 12,25 <sup>a</sup>	26,25 $\pm$ 18,87 <sup>b</sup>
(80A-0N)	16,25 $\pm$ 6,29 <sup>a</sup>	98,75 $\pm$ 2,50 <sup>d</sup>	100,00 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>	100,00 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>
(160A-0N)	97,50 $\pm$ 5,00 <sup>d</sup>	100,00 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>	100,00 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>	100,00 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>
(0A-7,5N)	3,75 $\pm$ 7,50 <sup>a</sup>	10,00 $\pm$ 14,14 <sup>a</sup>	16,25 $\pm$ 14,93 <sup>a</sup>	16,25 $\pm$ 14,93 <sup>ab</sup>
(0A-15N)	53,75 $\pm$ 11,90 <sup>b</sup>	73,75 $\pm$ 16,01 <sup>b</sup>	78,75 $\pm$ 14,93 <sup>b</sup>	80,00 $\pm$ 12,91 <sup>c</sup>
(0A-30N)	63,75 $\pm$ 8,54 <sup>bc</sup>	100,00 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>	100,00 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>	100,00 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>
(40A-7,5N)	67,50 $\pm$ 11,90 <sup>bc</sup>	75,00 $\pm$ 17,80 <sup>bc</sup>	80,00 $\pm$ 11,55 <sup>bc</sup>	100,00 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>
(40A-15N)	66,25 $\pm$ 12,50 <sup>bc</sup>	95,00 $\pm$ 7,07 <sup>cd</sup>	95,00 $\pm$ 7,07 <sup>bcd</sup>	100,00 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>
(40A-30N)	75,00 $\pm$ 10,80 <sup>c</sup>	90,00 $\pm$ 10,80 <sup>bcd</sup>	97,50 $\pm$ 5,00 <sup>cd</sup>	100,00 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>
(80A-7,5N)	81,25 $\pm$ 11,81 <sup>cd</sup>	96,25 $\pm$ 4,79 <sup>d</sup>	100,00 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>	100,00 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>
(80A-15N)	73,75 $\pm$ 4,79 <sup>bc</sup>	92,50 $\pm$ 5,00 <sup>bcd</sup>	100,00 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>	100,00 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>
(80A-30N)	71,25 $\pm$ 9,46 <sup>bc</sup>	95,00 $\pm$ 4,08 <sup>cd</sup>	100,00 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>	100,00 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>
(160A-7,5N)	100,00 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>	100,00 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>	100,00 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>	100,00 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>
(160A-15N)	100,00 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>	100,00 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>	100,00 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>	100,00 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>
(160A-30N)	100,00 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>	100,00 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>	100,00 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>	100,00 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>

Fonte: O autor (2022) Letras sobrescritas indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

Tabela 3 – Concentração letal mediana (CL<sub>50</sub>), intervalo de confiança e nível de segurança de amônia total em efeito isolado (I) e combinado (C) em 24, 48, 72 e 96 horas para larvas de *Macrobrachium amazonicum* submetidos a diferentes níveis de exposição.

Horas	CL <sub>50</sub>	Intervalo de Confiança	Nível de segurança
	(mg.L <sup>-1</sup> de Amônia Total)	CL <sub>50</sub> (mg.L <sup>-1</sup> de Amônia Total)	CL <sub>50</sub> (mg.L <sup>-1</sup> de Amônia Total)
24 I	97,48	88,95 – 106,01	9,48
48 I	64,79	55,17 – 74,42	6,47
72 I	61,75	52,23 – 71,28	6,17
96 I	57,01	47,32 – 66,71	5,70
24 C	60,68	58,28 – 63,08	6,06
48 C	44,28	36,57 – 52,00	4,28
72 C	42,23	32,81 – 51,65	4,22
96 C	40,58	29,78 – 51,40	4,05

Fonte: O autor (2022)

Tabela 4 – Concentração letal mediana (CL<sub>50</sub>), intervalo de confiança e nível de segurança de nitrito em efeito isolado (I) e combinado (C) em 24, 48, 72 e 96 horas para larvas de *Macrobrachium amazonicum* submetidos a diferentes níveis de exposição.

Horas	CL <sub>50</sub>	Intervalo de Confiança	Nível de segurança
	(mg.L <sup>-1</sup> de Nitrito)	CL <sub>50</sub> (mg.L <sup>-1</sup> de Nitrito)	CL <sub>50</sub> (mg.L <sup>-1</sup> de Nitrito)
24 I	19,58	18,87 – 20,28	1,95
48 I	12,67	11,51 – 13,82	1,26
72 I	11,90	10,65 – 13,16	1,19
96 I	11,64	10,42 – 12,86	1,16
24 C	9,26	9,08 – 9,43	0,92
48 C	6,57	5,56 – 7,57	0,65
72 C	7,43	5,94 – 8,91	0,74
96 C	7,80	6,07 – 9,52	0,78

Fonte: O autor (2022)

Após a obtenção dos valores de  $CL_{50}$  de 96h foi possível determinar a soma da aditividade dos compostos, sendo 1,10 para 24 horas, 1,20 para 48 horas, 1,31 para 72 horas e 1,38 para 96 horas, o que representa um efeito antagônico. O índice de aditividade calculado demonstrou que o efeito dos compostos combinados foi menor que a soma dos efeitos isolados em um fator de 0,10 vezes para 24 horas, 0,20 vezes para 48 horas, 0,31 vezes para 72 horas e 0,38 vezes para 96 horas.

## DISCUSSÃO

As concentrações de amônia total e nitrito que foram testadas, para os tratamentos isolados e combinados no presente estudo, ficaram dentro dos valores esperados após a diluição das soluções estoque utilizadas. Para o presente estudo os valores de oxigênio dissolvido, temperatura e pH estão de acordo com os valores recomendados para a fase testada (Moraes-Valenti e Valenti 2010).

De acordo com Moraes-Valenti e Valenti (2010), uma mortalidade de 20 até 30% é considerada normal para larvicultura de *M. amazonicum*. Em nosso trabalho, pode-se observar que no tratamento controle (sem adição de compostos nitrogenados) houve uma baixa porcentagem de mortalidade dentro das 96 horas, chegando a um máximo de 6,25%. Nos tratamentos com adição de amônia total, porém sem adição de nitrito (isolados de amônia), as mortalidades foram crescentes, assim como as concentrações utilizadas. No tratamento com  $40 \text{ mg.L}^{-1}$  foi observado 26,25% dentro das 96 horas, enquanto que em  $80 \text{ mg.L}^{-1}$  atingiu 100% de mortalidade em 72 horas e  $160 \text{ mg.L}^{-1}$  em 48 horas. Para os tratamentos com adição de nitrito e sem adição de amônia total (isolados de nitrito), as mortalidades também cresceram com o aumento das concentrações. No tratamento com  $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$  foi registrada 16,25% de mortalidade em 96 horas, em  $15 \text{ mg.L}^{-1}$  80% em 96 horas e em  $30 \text{ mg.L}^{-1}$  100% já em 48 horas.

Todos os tratamentos combinados (com adição de amônia e nitrito) resultaram em 100% de mortalidade após 96 horas. Os tratamentos com  $40 \text{ mg.L}^{-1}$  de amônia total combinados com as doses crescentes de nitrito (7,5; 15 e  $30 \text{ mg.L}^{-1}$ ), chegaram aos 100% de mortalidade somente no intervalo entre 72 e 96 horas de experimento, sendo possível observar que, até 72 horas, as mortalidades foram crescentes assim como as doses de nitrito. Para os tratamentos com  $80 \text{ mg.L}^{-1}$  de amônia combinados com as doses crescentes de nitrito houve 100% de mortalidade já em 72 horas de experimento. Por fim, onde houve a

maior concentração de amônia ( $160 \text{ mg.L}^{-1}$ ) combinados com as doses crescentes nitrito, as mortalidades totais ocorreram já dentro de 24 horas de experimento.

As Concentrações Letais medianas de amônia total encontradas no presente trabalho reduziram ao longo do período experimental, tanto para valores isolados, como para valores combinados. A  $CL_{50}$  de 96h combinada de amônia total foi de  $40,58 \text{ mg.L}^{-1}$  enquanto o valor isolado foi de  $57,01 \text{ mg.L}^{-1}$ . Brazão *et al.* (2021) trabalhando com juvenis da mesma espécie encontrou uma  $CL_{50}$  de 96 horas combinada de amônia total de  $20,87 \text{ mg.L}^{-1}$  e uma isolada de  $29,85 \text{ mg.L}^{-1}$ . Já no trabalho com pós-larvas os valores encontrados foram de  $22,14 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $23,87 \text{ mg.L}^{-1}$  para  $CL_{50}$  isolada e combinada (Brazão *et al.* 2022). Um maior valor de  $CL_{50}$  na fase larval quando comparado a fases de vida mais avançadas pode ser explicado pelo fato da larvicultura de *M. amazonicum* ocorrer em uma salinidade de 12 ppt, assim como no presente experimento (Romano e Zeng, 2013). Com relação ao nitrito, as  $CL_{50}$  reduziram para valores isolados, mas para valores combinados, foi possível observar um maior valor para 24 horas e um aumento dos valores de 48 para 72 e 96 horas, possivelmente pela interação de nitrito com a amônia. A  $CL_{50}$  de 96h combinada foi de  $7,80 \text{ mg.L}^{-1}$  e a isolada de  $11,64 \text{ mg.L}^{-1}$ , valores menores que o valor de  $CL_{50}$  encontrado no capítulo anterior ( $15,36 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Para juvenis da espécie Brazão *et al.* (2021) encontrou valores de  $2,95$  e  $2,49 \text{ mg.L}^{-1}$  para  $CL_{50}$  de 96h combinada e isolada. Os valores encontrados por Brazão *et al.* 2022 para pós-larvas foram de  $1,68$  e  $1,36 \text{ mg.L}^{-1}$ , sendo novamente possível ver a influência da salinidade nos valores de  $CL_{50}$  (Romano e Zeng, 2013). Isso porque em ambientes onde há uma menor concentração de sais, o líquido externo tende a entrar com mais facilidade no organismo devido a pressão osmótica. Já em ambientes com mais concentração de sais, a tendência é inversa, (Schmidt-Nielsen, 2000).

Os valores encontrados na soma da aditividade dos compostos representam um efeito antagônico, efeito que foi similar, porém mais sutil, do que o encontrado por Brazão *et al.* (2021) em experimento de efeito combinado para juvenis da mesma espécie. Os índices de atividade mostram que a soma dos efeitos compostos (amônia total e nitrito) foram de 0,10 a 0,38 vezes menor em valores de mortalidade que quando isolados enquanto Brazão *et al.* (2021) encontrou um valor de 0,88 vezes menor. Brazão *et al.* (2022) em outro trabalho com a espécie, porém para pós-larvas, novamente observaram um efeito antagônico de amônia total e nitrito, neste mesmo trabalho foi possível ver o mesmo efeito para a espécie *M. rosenbergii*. Zhang *et al.* (2015) em trabalho com camarões adultos da espécie *M. rosenbergii* observaram um menor nível de estresse dos camarões submetidos

aos compostos combinados. Ainda, conforme relatam os autores, o efeito combinado destes compostos causa menos mudanças fisiológicas, sendo explicada pela interação que ocorre do nitrito com alguns íons de cloreto, como por exemplo o cloreto de amônio, que acarreta a diminuição do seu efeito tóxico pela ligação de radicais livres de cloreto, que entram em conformação e dificultam a absorção pelas brânquias.

Outros crustáceos, porém, marinhos, foram objeto de estudo da interação de amônia total com nitrito. Chen e Chin (1988) encontraram tanto o efeito antagônico como o sinérgico para pós-larvas de *Penaeus monodon*, sendo o primeiro para 48 e 72 horas de estudo e o segundo para 96 horas. Chen et al. (1989) observaram um efeito sinérgico para náuplios de artêmias após 48 horas de exposição. Alcaraz et al. (1999) observaram em pós-larvas de *Penaeus setiferus* um efeito sinérgico em 48 horas de exposição, contudo antagônico após 72 horas. Schuler et al (2010), também encontraram ambos os efeitos em pós-larvas de *Litopenaeus vannamei*. Já Cheng et al. (2013) encontram um efeito sinérgico de amônia e nitrito para *Marsupenaeus japonicus*.

Vários fatores podem ser considerados quando observados os resultados da interação dos compostos, entre eles podemos citar: a espécie, fase de vida, tempo de duração do teste de toxicidade e a presença ou não de salinidade. Contudo, ao que tudo indica, para a espécie *M. amazonicum*, independe dos fatores, é observado constantemente um efeito antagônico quando submetidos a interação de amônia e nitrito.

## CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados, mostraram que, quando submetidos exposições agudas, de diferentes concentrações de amônia total e nitrito em combinação, durante 96 horas, as larvas do camarão-da-amazônia demonstraram maior tolerância a estes compostos (efeito antagônico) do que quando submetidos a estes compostos isoladamente.

## REFERÊNCIAS

- Alcaraz, G., Chiappa-Carrara, X., And, V. E., & Vanegas, C., 1999. Acute toxicity of ammonia and nitrite to white shrimp *Penaeus setiferus* postlarvae. *Journal of the World Aquaculture Society*, 30(1), 90-97. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1999.tb00321.x>
- Baumgarten, M.G.Z., 1996. Manual de análises em oceanografia química. Furg, Rio Grande, p. 132.
- Brazao, C. C., Kracizy, R. O., Dutra, F. M., de Oliveira, A. P., da Silva, R. I., & Ballester, E. L. C., 2021. Combined and isolated effects of ammonia and nitrite on Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) juveniles. *Aquaculture*, 533, 736204. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736204>
- Brazão, C. C., Kracizy, R. O., Dutra, F. M., Rodrigues, M. C. G., & Ballester, E. L. C., 2022. Combined effect of ammonia and nitrite for *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) and *Macrobrachium rosenbergii* (De man, 1879) post-larvae. *Aquaculture*, 551, 737880. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737880>
- Chen, J. C., Chen, K. J., & Liao, J. M., 1989. Joint action of ammonia and nitrite on *Artemia nauplii*. *Aquaculture*, 77(4), 329-336. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(89\)90217-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(89)90217-2)
- Chen, J. C., & Chin, T. S., 1988. Joint action of ammonia and nitrite on tiger prawn *Penaeus monodon* postlarvae. *Journal of the World Aquaculture Society*, 19(3), 143-148. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1988.tb00942.x>
- Cheng, S. Y., Shieh, L. W., & Chen, J. C., 2013. Changes in hemolymph oxyhemocyanin, acid–base balance, and electrolytes in *Marsupenaeus japonicus* under combined ammonia and nitrite stress. *Aquatic toxicology*, 130, 132-138. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.12.015>
- Ciji, A., & Akhtar, M. S., 2020. Nitrite implications and its management strategies in aquaculture: A review. *Reviews in Aquaculture*, 12(2), 878-908. <https://doi.org/10.1111/raq.12354>
- Dantas, D. P., Flickinger, D. L., Costa, G. A., Batlouni, S. R., Moraes-Valenti, P., & Valenti, W. C., 2020. Technical feasibility of integrating Amazon river prawn culture during the first phase of tambaqui grow-out in stagnant ponds, using nutrient-rich water. *Aquaculture*, 516, 734611. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734611>
- Dantas, D. P., Flickinger, D. L., Costa, G. A., Moraes-Valenti, P., & Valenti, W. C., 2022. Economic effects of production scale, use of agricultural greenhouses, and integration of tropical aquaculture species when farming in a subtropical climate. *Aquaculture International*, 30(2), 547-579. <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00822-2>

Guest, W. C., 1979. Laboratory life history of the palaemonid shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Heller)(Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana*, 37(2), 141-152.

F. Koroleff, 1976. Determination of nutrients K. Grasshoff (Ed.), *Methods of Seawater Analysis*, Verlag Chemie Weinheim, pp. 117-181

Mantoan, P., Ballester, E., Ramaglia, A.C., Augusto, A., 2021. Diet containing 35% crude protein improves energy balance, growth, and feed conversion in the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*. *Aquacult. Rep.* 21, 100962 <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100962>.

Moraes-Valenti P, Valenti WC, 2010. Culture of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*. In: New MB, Valenti WC, Tidwell JH, D'Abramo LR, Kutty MN (eds) *Freshwater prawns: biology and farming*. Wiley-Blackwell, Oxford, pp 485–501

Pincinato, R. B. M., & Asche, F., 2016. Market integration in Brazilian shrimp markets. *Aquaculture Economics & Management*, 20(4), 357-367. <https://doi.org/10.1080/13657305.2016.1212124>

Rand, G. M., Wells, P. G., & McCarty, L. S., 2020. Introduction to aquatic toxicology. In *Fundamentals of aquatic toxicology* (pp. 3-67). CRC Press.

Rodrigues, C. G., Garcia, B. F., Verdegem, M., Santos, M. R., Amorim, R. V., & Valenti, W. C., 2019. Integrated culture of Nile tilapia and Amazon river prawn in stagnant ponds, using nutrient-rich water and substrates. *Aquaculture*, 503, 111-117. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.073>

Romano, N., & Zeng, C., 2013. Toxic effects of ammonia, nitrite, and nitrate to decapod crustaceans: a review on factors influencing their toxicity, physiological consequences, and coping mechanisms. *Reviews in Fisheries Science*, 21(1), 1-21. <https://doi.org/10.1080/10641262.2012.753404>

Schuler, D. J., Boardman, G. D., Kuhn, D. D., & Flick, G. J. (2010). Acute toxicity of ammonia and nitrite to Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at low salinities. *Journal of the World Aquaculture Society*, 41(3), 438-446. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2010.00385.x>

Sprague, J. B., 1971. Measurement of pollutant toxicity to fish—III: Sublethal effects and “safe” concentrations. *Water research*, 5(6), 245-266. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(71\)90171-0](https://doi.org/10.1016/0043-1354(71)90171-0)

Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 2012. *Biometry: Principle and Practices of Statistics in Biological Research*, fourth ed. W.H. Freeman e Company, New York.

Schmidt-Nielsen, K. (2000). *Fisiologia Animal: Adaptação E Meio Ambiente*. Grupo Gen-Livraria Santos Editora Ltda.

Silva, T. A. D., Ballester, E. L. C., & Cunico, A. M, 2020. First records of non-native species Malaysian prawn *Macrobrachium rosenbergii* (Decapoda: Palaemonidae) in an important South American hydrographic system. *Acta Limnologica Brasiliensia*, v. 32. <https://doi.org/10.1590/S2179-975X8319>

Tomasso, J. R., 1994. Toxicity of nitrogenous wastes to aquaculture animals. *Reviews in Fisheries Science*, 2(4), 291-314. <https://doi.org/10.1080/10641269409388560>

Valenti, W. C., Barros, H. P., Moraes-Valenti, P., Bueno, G. W., & Cavalli, R. O., 2021. Aquaculture in Brazil: past, present and future. *Aquaculture Reports*, 19, 100611. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100611>

Zagatto, P.A., Bertoletti, E., 2008. *Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações*. Rima, São Carlos.

Zhao, M., Yao, D., Li, S., Zhang, Y., & Aweya, J. J., 2020. Effects of ammonia on shrimp physiology and immunity: a review. *Reviews in Aquaculture*, 12(4), 2194-2211. <https://doi.org/10.1111/raq.12429>

Zhang, Y., Ye, C., Wang, A., Zhu, X., Chen, C., Xian, J., & Sun, Z., 2015. Isolated and combined exposure to ammonia and nitrite in giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*): effects on the oxidative stress, antioxidant enzymatic activities and apoptosis in haemocytes. *Ecotoxicology*, 24(7), 1601-1610. <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1477-x>

### **CAPÍTULO III**

**Efeito crônico de amônia total e nitrito para larvas do camarão-da-amazônia**  
***Macrobrachium amazonicum***

Níveis sub-letais de amônia total e nitrito para larvas de *Macrobrachium amazonicum*

**RESUMO**

Assim como os testes de interação de compostos, os testes de toxicidade crônica também são pouco frequentes, isso porque, tradicionalmente, utiliza-se o método proposto por Sprague (1971) para se estimar o nível de segurança dos compostos tóxicos aos quais os organismos aquáticos estão expostos por longos períodos de exposição. Desta forma o objetivo no presente trabalho foi avaliar os efeitos da exposição crônica em larvas de *Macrobrachium amazonicum* submetidos a níveis subletais de amônia total e nitrito. Para realização dos testes crônicos foi utilizado um sistema experimental randomizado, com três réplicas por tratamento. Além de um tratamento controle (sem adição de amônia total ou nitrito), foram testadas as concentrações de 4, 8 e 16 mg.L<sup>-1</sup> para amônia total e 0,75; 1,5 e 3 mg.L<sup>-1</sup> para nitrito. Esses valores correspondem a metade dos níveis de segurança, o nível de segurança e o dobro do nível de segurança de cada composto calculado para 96 horas no Capítulo I. Para cada unidade experimental foram selecionados e transferidos 20 animais. Após o povoamento foram acrescentadas as soluções nas unidades experimentais, sendo que cada adição consistiu em uma diferente concentração de amônia total ou nitrito, oriunda de solução padrão. Para manter as concentrações experimentais, 100% do volume útil dos tanques foi renovado a cada dois dias, e as soluções foram adicionadas novamente para a manutenção das concentrações experimentais. Ao final do experimento, todos animais foram contados para contabilizar a sobrevivência e foi realizado a verificação do estágio larval. Os dados de estágios larvais foram submetidos a duas análises diferentes, na primeira fez-se uma comparação da frequência de estágios observados. Enquanto na segunda analisou-se as porcentagens de estágios que atingiram o oitavo estágio de desenvolvimento ou superior. Em nossos resultados é possível observar que os níveis de toxicidade crônica de amônia total e nitrito não influenciaram significativamente nos valores de mortalidade, contudo, quando expostos ao dobro do nível de segurança dos compostos avaliados, pode-se observar um atraso no desenvolvimento larval de *M. amazonicum*. Um atraso no desenvolvimento larval resultará em mais dias de produção na fase de larvicultura, o que não é interessante, pois aumentará os custos para a produção de pós-larvas.

**Palavras-chave:** Zoea, Carcinicultura, Larvicultura, toxicidade

## INTRODUÇÃO

Na atividade de carcinicultura, para a obtenção de formas jovens, é necessário realizar uma larvicultura que permita a obtenção de pós-larvas em quantidade e qualidade suficientes para abastecer os sistemas de produção. Vários sistemas podem ser empregados com esse intuito, sendo indispensável o planejamento da estrutura física, bem como os manejos a serem utilizados no sistema produtivo (Valenti et al, 2010). Um dos manejos necessários é o monitoramento constante dos compostos nitrogenados, que embora levem a preocupação somente quando ocorrem elevadas concentrações, também podem ocasionar em problemas quando presentes de forma crônica em níveis subletais (Zagatto e Bertoletti, 2008).

Assim como os testes de interação de compostos, os testes de toxicidade crônica também são pouco frequentes, isso porque, tradicionalmente, utiliza-se o método proposto por Sprague (1971) para se estimar o nível de segurança dos compostos tóxicos aos quais os organismos aquáticos estão expostos por longos períodos de exposição. Apesar de ser considerado um método consagrado, sua estimativa pode não ser tão exata, pois alguns efeitos causados pelos compostos podem não ser detectados pelos testes de toxicidade aguda, pois ocorrem de maneira subletal, causando desordem fisiológica ou comportamental (Zagatto e Bertoletti, 2008). Desta maneira observou-se a necessidade de uma avaliação mais precisa, os testes de toxicidade crônica, que podem ser realizados em uma determinada fase de vida de um organismo. Segundo Mckim (1977), o teste em uma determinada fase de vida de uma espécie, possibilita aplicar ensaios nos períodos mais sensíveis do organismo-teste, que seria nas fases iniciais de vida, permitindo avaliar os efeitos sobre o crescimento, sobrevivência e até mesmo a reprodução.

Como os organismos aquáticos estão constantemente expostos a algumas formas nitrogenadas que são abundantes nos ambientes naturais e de produção e tem a tendência de provocar danos significativos, como a amônia, o nitrito e o nitrato (Romano e Zeng, 2013; Ciji e Akhtar, 2020; Zhao et al., 2020); a investigação dos efeitos sub-letais se faz necessária, sendo que os restos alimentares e a excreção dos organismos são os principais meios de origem desses compostos (Gross et al. 2000; Valenti et al., 2010).

Recentemente, a espécie *Macrobrachium amazonicum*, foi alvo de um estudo de toxicidade crônica de amônia total e nitrito com foco no consumo alimentar

(Campos et al, 2021). Tais iniciativas são fundamentais para aumentarmos o entendimento que os compostos tóxicos podem exercer em espécies consolidadas em atividades de aquicultura e com potencial para a mesma (Rodrigues et al., 2019; Dantas et al., 2020; Dantas et al., 2022). Desta forma o objetivo no presente trabalho foi avaliar os efeitos da exposição crônica em larvas de *M. amazonium* submetidos a níveis subletais de amônia total e nitrito.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Carcinicultura, localizado no Núcleo de Pesquisas e Desenvolvimento em Aquicultura Sustentável (LABCAR – NPDA). As larvas utilizadas foram obtidas de reprodutores do laboratório, doados pelo Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) de Jaboticabal, SP, Brasil, originários de uma população do nordeste do Pará, Brasil (Mantoan et al., 2021).

Após a eclosão em água com salinidade a 4 ppt, as larvas foram transferidas para tanques de larvicultura, onde novamente foram aclimatadas a uma salinidade de 12 ppt. As larvas foram mantidas e alimentadas nesse sistema até atingirem o estágio de desenvolvimento larval de zoea III, segundo a classificação proposta por Guest (1979). Para realização dos testes crônicos foi utilizado um sistema experimental randomizado, com três réplicas por tratamento. Além de um tratamento controle (sem adição de amônia total ou nitrito), foram testadas as concentrações de 4, 8 e 16 mg.L<sup>-1</sup> para amônia total e 0,75; 1,5 e 3 mg.L<sup>-1</sup> para nitrito. Esses valores correspondem a metade dos níveis de segurança, o nível de segurança e o dobro do nível de segurança de cada composto calculado para 96 horas no Capítulo I.

Para cada unidade experimental foram selecionados e transferidos 20 animais, as unidades eram constituídas de potes plásticos contendo 0,5 L de água e salinidade 12 ppt com aeração constante. Após o povoamento foram acrescentados mais 0,5 L de água nas unidades experimentais, sendo que cada nova adição consistiu em uma diferente concentração de amônia total ou nitrito, oriunda de solução padrão. Para amônia utilizou-se Cloreto de amônio P.A na concentração de 1000 mg.L<sup>-1</sup>, enquanto que para nitrito foi utilizado Nitrito de Sódio P.A na concentração de 1000 mg.L<sup>-1</sup> com o objetivo de chegar às concentrações testadas em cada tratamento. Para manter as concentrações experimentais, 100% do volume útil dos tanques foi renovado a cada dois dias, e as soluções foram adicionadas novamente para a manutenção das

concentrações experimentais, adaptando a metodologia proposta por (Melo et al., 2016). A cada troca de solução, foram analisados os parâmetros de qualidade de água. A amônia total foi avaliada pelo método de Koroleff (1976) e nitrito foi analisado pelo método de Reação de Griess (Baumgarten, 1996). Oxigênio dissolvido e temperatura foram aferidos com equipamento HANNA HI9146 e pH com phmetro de bancada (LUCAMEDA LUCA-210). O monitoramento da salinidade durante o experimento foi feito com auxílio de Refratômetro Analógico (LORBEN 211). Após o início do experimento, as larvas foram contadas a cada 2 dias e durante esse processo, as que se encontravam mortas foram retiradas e descartadas. O critério para avaliação da mortalidade, foi a ausência de resposta motora a partir de estímulos mecânicos com pipeta plástica de Pasteur. Os registros ocorreram após 2, 4, 6, 8 e 10 dias da exposição às crescentes concentrações de amônia total e nitrito. As larvas foram alimentadas diariamente com náuplios de *Artemia sp.* recém eclodidos na proporção de 20 a 40 náuplios/larva. Foi mantido um fotoperíodo de 12:12 horas em sala climatizada.

Ao final do experimento, todos animais foram contados e foi realizado a verificação do estágio larval conforme Guest (1979). Os dados de estágios larvais foram submetidos a duas análises diferentes. Na primeira fez-se uma comparação da frequência de estágios observados pelo teste Kruskal-Wallis com comparação pelo teste de Dwass-Steel-Critchlow-Fligner. Já na segunda análise, as porcentagens de estágios que atingiram o oitavo estágio de desenvolvimento ou superior, assim como os dados de mortalidade passaram pela verificação dos pressupostos de normalidade e homogeneidade por meio dos testes de Shapiro & Wilks e Levene (Sokal 2012), respectivamente. Após a verificação dessas premissas, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

## **RESULTADOS**

Os dados das variáveis de qualidade de água foram agrupados por tratamento para obtenção das médias e desvio padrão e são apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Média e desvio padrão das variáveis de qualidade de água nas unidades experimentais contendo larvas de *Macrobrachium amazonicum* submetidos a diferentes níveis de exposição crônica de amônia total e nitrito.

TRATAMENTO	Amônia (mg.L <sup>-1</sup> ) Valor de Leitura	Nitrito (mg.L <sup>-1</sup> ) Valor de Leitura	Temperatura (°C)	Oxigênio dissolvido (mg/ L)	pH
Controle	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	28,2 ± 0,5	7,3 ± 0,4	8,2 ± 0,1
4 mg.L <sup>-1</sup> amônia	3,9 ± 0,6	0,0 ± 0,0	28,0 ± 0,5	7,6 ± 0,5	8,2 ± 0,1
8 mg.L <sup>-1</sup> amônia	7,7 ± 0,7	0,0 ± 0,0	28,0 ± 0,5	7,7 ± 0,4	8,2 ± 0,1
16 mg.L <sup>-1</sup> amônia	15,8 ± 1,6	0,0 ± 0,0	28,0 ± 0,5	7,7 ± 0,3	8,2 ± 0,1
0,75 mg.L <sup>-1</sup> nitrito	0,0 ± 0,0	0,72 ± 0,1	28,0 ± 0,5	7,9 ± 0,4	8,2 ± 0,1
1,5 mg.L <sup>-1</sup> nitrito	0,0 ± 0,0	1,4 ± 0,0	28,0 ± 0,6	7,9 ± 0,4	8,2 ± 0,1
3 mg.L <sup>-1</sup> nitrito	0,0 ± 0,0	2,9 ± 0,1	28,0 ± 0,6	7,9 ± 0,5	8,2 ± 0,1
Valores referência*			28 a 30	≥ 6	~ 8

\*Valores recomendados por Moraes-Valenti e Valenti (2010)

Fonte: O autor (2022)

Tabela 2 – Média e desvio padrão de sobrevivência de larvas de *Macrobrachium amazonicum* submetidos a diferentes níveis de exposição crônica de amônia total e nitrito.

TRATAMENTO	Dia 0	Dia 2	Dia 4	Dia 6	Dia 8	Dia 10
Controle	100,0 ± 0,0	96,7 ± 2,9	78,3 ± 7,6	76,7 ± 5,8	61,7 ± 11,5	46,7 ± 5,8
4 mg.L <sup>-1</sup> amônia	100,0 ± 0,0	100 ± 0,0	95,0 ± 5,0	93,3 ± 5,8	70,0 ± 36,1	70,0 ± 36,1
8 mg.L <sup>-1</sup> amônia	100,0 ± 0,0	96,7 ± 2,9	91,7 ± 7,6	90,0 ± 5,0	81,7 ± 15,3	76,7 ± 18,9
16 mg.L <sup>-1</sup> amônia	100,0 ± 0,0	98,3 ± 2,9	98,3 ± 2,9	95,0 ± 0,0	91,7 ± 2,9	88,9 ± 2,9
0,75 mg.L <sup>-1</sup> nitrito	100,0 ± 0,0	100 ± 0,0	98,3 ± 2,9	98,3 ± 2,9	85,0 ± 18,0	81,7 ± 20,2
1,5 mg.L <sup>-1</sup> nitrito	100,0 ± 0,0	98,3 ± 2,9	98,3 ± 2,9	96,7 ± 2,9	70,0 ± 27,8	66,7 ± 27,5
3 mg.L <sup>-1</sup> nitrito	100,0 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0	95,0 ± 5,0	91,7 ± 2,9	66,7 ± 40,4

Fonte: O autor (2022)

Tabela 3 – Tabela de frequência de estágio larval de larvas de *Macrobrachium amazonicum* submetidos a diferentes níveis de exposição crônica de amônia total. Letras sobrescritas diferentes na coluna de tratamento indicam diferenças significativas (P <0,05).

Estágio Larval	V	VI	VII	VIII	IX
<b>Controle<sup>a</sup></b>	0	0	1	26	1
<b>4 mg.L<sup>-1</sup> amônia<sup>a</sup></b>	0	0	3	37	2
<b>8 mg.L<sup>-1</sup> amônia<sup>a</sup></b>	0	0	1	42	3
<b>16 mg.L<sup>-1</sup> amônia<sup>b</sup></b>	0	4	31	18	0

Fonte: O autor (2022)

Tabela 4 – Tabela de frequência de estágio larval de larvas de *Macrobrachium amazonicum* submetidos a diferentes níveis de exposição crônica de nitrito. Letras sobrescritas diferentes na coluna de tratamento indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

Estágio Larval	V	VI	VII	VIII	IX
<b>Controle<sup>a</sup></b>	0	0	1	26	1
<b>0,75 mg.L<sup>-1</sup> nitrito<sup>a</sup></b>	0	0	1	37	11
<b>1,5 mg.L<sup>-1</sup> nitrito<sup>a</sup></b>	0	0	4	33	3
<b>3 mg.L<sup>-1</sup> nitrito<sup>b</sup></b>	0	2	15	23	0

Fonte: O autor (2022)

Tabela 5 – Média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem de larvas de *Macrobrachium amazonicum* que alcançaram o estágio VIII ou superior após a exposição crônica de amônia total. Letras sobrescritas diferentes na coluna de tratamento indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

Estágio Larval	$\geq$ VIII
<b>Controle</b>	95,83 $\pm$ 7,22 <sup>a</sup>
<b>4 mg.L<sup>-1</sup> amônia</b>	94,17 $\pm$ 6,29 <sup>a</sup>
<b>8 mg.L<sup>-1</sup> amônia</b>	98,15 $\pm$ 3,21 <sup>a</sup>
<b>16 mg.L<sup>-1</sup> amônia</b>	33,66 $\pm$ 16,18 <sup>b</sup>

Fonte: O autor (2022)

Tabela 6 – Média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem de larvas de *Macrobrachium amazonicum* que alcançaram o estágio VIII ou superior após a exposição crônica de nitrito. Letras sobrescritas diferentes na coluna de tratamento indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

Estágio Larval	$\geq$ VIII
<b>Controle</b>	95,83 $\pm$ 7,22 <sup>a</sup>
<b>0,75 mg.L<sup>-1</sup> nitrito</b>	98,33 $\pm$ 2,89 <sup>a</sup>
<b>1,5 mg.L<sup>-1</sup> nitrito</b>	92,98 $\pm$ 12,16 <sup>a</sup>
<b>3 mg.L<sup>-1</sup> nitrito</b>	55,55 $\pm$ 9,62 <sup>b</sup>

Fonte: O autor (2022)

## DISCUSSÃO

As concentrações de amônia total e nitrito, ficaram dentro dos valores esperados após a diluição das soluções estoques preparadas para os experimentos. Para ambos os experimentos, os valores médios de temperatura, oxigênio dissolvido e pH ficaram dentro do recomendado para fase de larvicultura de *M. amazonicum* segundo Moraes-Valenti e Valenti (2010).

Após os 10 dias de experimento não foi possível observar uma diferença significativa entre os diferentes tratamentos nos dados de sobrevivência, contudo no tratamento controle houve uma mortalidade maior que o recomendado por Moraes-Valenti e Valenti, (2010) para larvicultura da espécie. Essa mortalidade pode ser explicada pelo stress do confinamento e dos manejos realizados nas trocas de soluções. Soma-se a isso o fato de as larvas não terem sido isoladas em subunidades experimentais devido ao seu tamanho, prática usual em experimentos de toxicidade (Brazão et al., 2021, Brazão et al., 2022), onde busca-se eliminar o possível efeito agonístico e de canibalismo nos dados de mortalidade (Dutra et al., 2016; Dutra et al., 2022). Além disso, em função das larvas não estarem sob o stress causado pelo efeito dos compostos nitrogenados, elas podem ter se tornado mais agressivas, potencializando o canibalismo e o comportamento agonístico (Preto, 2008; Maciel e Valenti, 2014; Brazão et al., 2022).

Por meio da verificação dos estágios larvais ao fim dos 10 dias de exposição crônica, foi possível determinar que quando submetidos ao dobro de nível de segurança proposto por Sprague (1971) há uma diferença significativa no desenvolvimento dos estágios larvais. Considerando que os animais iniciaram o teste experimental no terceiro estágio de desenvolvimento larval, após 10 dias esperava-se que majoritariamente estivessem em seu oitavo estágio de desenvolvimento (Moraes-Valenti e Valenti, 2010). Da mesma forma, em outro experimento com exposição crônica de amônia total e nitrito, para pós-larvas de *M. amazonicum*, foi observado que o consumo alimentar apresentou alterações significativas para todos os camarões expostos as concentrações de nitrito e a concentração com o dobro do nível de segurança do valor recomendado para amônia total, o que pode influenciar o desempenho em sistemas de cultivo (Campos et al, 2021). Por esse motivo, fica evidente a necessidade de realização dos testes de toxicidade crônica, além do valor teórico proposto por Sprague (1971). O nível de segurança para 96 horas calculado

no primeiro capítulo e desafiado no presente capítulo, de fato mostra-se seguro, tendo em vista que os animais expostos a ele tiveram desenvolvimento larval satisfatório. Contudo, quando extrapolado esse valor, é perceptível a influência dos compostos nitrogenados quando avaliado o desenvolvimento larval. Um atraso no desenvolvimento larval resultará em mais dias de produção na fase de larvicultura, o que não é interessante, pois aumentará os custos para a produção de pós-larvas (Valenti et al., 2010). Dentro destes custos estão a mão de obra, gastos com energia e outros insumos, como a *Artemia*, essencial para o sucesso da larvicultura, porém de elevado custo (Dhont et al., 2010; Bengtson et al., 2018).

## CONCLUSÃO

Os níveis de toxicidade crônica de amônia total e nitrito não influenciaram significativamente nos valores de mortalidade, contudo, quando expostos ao dobro do nível de segurança dos compostos avaliados, pode-se observar um atraso no desenvolvimento larval de *M. amazonicum*.

## REFERÊNCIAS

- Baumgarten, M.G.Z., 1996. Manual de análises em oceanografia química. Furg, Rio Grande, p. 132.
- Bengtson, D. A., Léger, P., & Sorgeloos, P., 2018. Use of Artemia as a food source for aquaculture. In *Artemia biology* (pp. 255-286). CRC Press.
- Brazao, C. C., Kracizy, R. O., Dutra, F. M., de Oliveira, A. P., da Silva, R. I., & Ballester, E. L. C., 2021. Combined and isolated effects of ammonia and nitrite on Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) juveniles. *Aquaculture*, 533, 736204. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736204>
- Brazão, C. C., Kracizy, R. O., Dutra, F. M., Rodrigues, M. C. G., & Ballester, E. L. C., 2022. Combined effect of ammonia and nitrite for *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) and *Macrobrachium rosenbergii* (De man, 1879) post-larvae. *Aquaculture*, 551, 737880. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737880>
- Campos, B. R., Kracizy, R. O., Furtado, P. S., Zadinelo, I. V., Ballester, E. L. C., 2021. Effects of ammonia and nitrite on food consumption of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) postlarvae. *Latin american journal of aquatic research*, 49(4), 684-688. <http://dx.doi.org/10.3856/vol49-issue4-fulltext-2583>
- Ciji, A., & Akhtar, M. S., 2020. Nitrite implications and its management strategies in aquaculture: A review. *Reviews in Aquaculture*, 12(2), 878-908. <https://doi.org/10.1111/raq.12354>
- Guest, W. C., 1979. Laboratory life history of the palaemonid shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Heller)(Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana*, 37(2), 141-152.
- Dantas, D. P., Flickinger, D. L., Costa, G. A., Batlouni, S. R., Moraes-Valenti, P., & Valenti, W. C., 2020. Technical feasibility of integrating Amazon river prawn culture during the first phase of tambaqui grow-out in stagnant ponds, using nutrient-rich water. *Aquaculture*, 516, 734611. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734611>
- Dantas, D. P., Flickinger, D. L., Costa, G. A., Moraes-Valenti, P., & Valenti, W. C., 2022. Economic effects of production scale, use of agricultural greenhouses, and integration of tropical aquaculture species when farming in a subtropical climate. *Aquaculture International*, 30(2), 547-579. <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00822-2>

Dhont, J., Wille, M., Frinsko, M., Coyle, S. D., & Sorgellos, P., 2010. Larval feeds and feeding. In: New MB, Valenti WC, Tidwell JH, D'Abramo LR, Kutty MN (eds) *Freshwater prawns: biology and farming*. Wiley-Blackwell, Oxford, pp 86–107.

Dutra, F. M., Forneck, S. C., Brazão, C. C., Freire, C. A., & Ballester, E. L. C., 2016. Acute toxicity of ammonia to various life stages of the Amazon river prawn, *Macrobrachium amazonicum*, Heller, 1862. *Aquaculture*, 453, 104-109. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.038>

Dutra, F. M., Gomes, M. K. C., Furtado, P. S., Rönnau, M., & Ballester, E. L. C., 2022. Effect of nitrate on the performance and welfare of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) juveniles. *Aquaculture*, 547, 737428. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737428>

F. Koroleff, 1976. Determination of nutrients K. Grasshoff (Ed.), *Methods of Seawater Analysis*, Verlag Chemie Weinheim, pp. 117-181

Macêdo, J.A.B., 2005. *Métodos Laboratoriais de Análises Físico-químicas & Microbiológicas*. JAB Macêdo.

Maciel, C. R., & Valenti, W. C., 2014. Effect of tank colour on larval performance of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*. *Aquaculture Research*, 45(6), 1041-1050. <https://doi.org/10.1111/are.12048>

Mantoan, P., Ballester, E., Ramaglia, A.C., Augusto, A., 2021. Diet containing 35% crude protein improves energy balance, growth, and feed conversion in the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*. *Aquacult. Rep.* 21, 100962 <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100962>.

McKim, J. M., 1977. Evaluation of tests with early life stages of fish for predicting long-term toxicity. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 34(8), 1148-1154. <https://doi.org/10.1139/f77-172>

Melo, F. P., Ferreira, M. G. P., Braga, I. F. M., Correa, E. S., 2016. Toxicidade do nitrito para o camarão *Litopenaeus vannamei* cultivado em sistemas de água clara e bioflocos. *Boletim do Instituto de Pesca*, 42(4), 855-865. <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2016v42n4p855>

Moraes-Valenti P, Valenti WC, 2010. Culture of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*. In: New MB, Valenti WC, Tidwell JH, D'Abramo LR, Kutty MN (eds) *Freshwater prawns: biology and farming*. Wiley-Blackwell, Oxford, pp 485–501

Preto, B. L., Pizzato, G. M., Valenti, W. C., 2008. Uso de bandejas de alimentação na fase de engorda do camarão-da-amazônia, *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862). *Boletim do Instituto de Pesca*, 34(1), 125-130.

Rodrigues, C. G., Garcia, B. F., Verdegem, M., Santos, M. R., Amorim, R. V., & Valenti, W. C., 2019. Integrated culture of Nile tilapia and Amazon river prawn in stagnant ponds, using nutrient-rich water and substrates. *Aquaculture*, 503, 111-117. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.073>

Romano, N., & Zeng, C., 2013. Toxic effects of ammonia, nitrite, and nitrate to decapod crustaceans: a review on factors influencing their toxicity, physiological consequences, and coping mechanisms. *Reviews in Fisheries Science*, 21(1), 1-21. <https://doi.org/10.1080/10641262.2012.753404>

Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 2012. *Biometry: Principle and Practices of Statistics in Biological Research*, fourth ed. W.H. Freeman e Company, New York.

Sprague, J. B. (1971). Measurement of pollutant toxicity to fish—III: Sublethal effects and “safe” concentrations. *Water research*, 5(6), 245-266. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(71\)90171-0](https://doi.org/10.1016/0043-1354(71)90171-0)

Valenti W.C, Daniels, W. H, New, M. B, Correia, E. S., 2010. Hatchery Systems and Management. In: New MB, Valenti WC, Tidwell JH, D’Abramo LR, Kutty MN (eds) *Freshwater prawns: biology and farming*. Wiley-Blackwell, Oxford, pp 55–85

Zagatto, P.A., Bertoletti, E., 2008. *Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações*. Rima, São Carlos.

Zhao, M., Yao, D., Li, S., Zhang, Y., & Aweya, J. J., 2020. Effects of ammonia on shrimp physiology and immunity: a review. *Reviews in Aquaculture*, 12(4), 2194-2211. <https://doi.org/10.1111/raq.12429>

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

No primeiro capítulo pode-se determinar os valores de  $CL_{50}$  de amônia total que neste estudo foram de 119,51; 94,25; 85,99 e 80,68  $mg.L^{-1}$  para 24, 48, 72 e 96 horas, respectivamente. Os níveis de segurança para 24, 48, 72 e 96 horas que foram 11,95; 9,42; 8,59 e 8,06  $mg.L^{-1}$ . Para nitrito os valores de  $CL_{50}$  foram de 96,55; 28,19; 15,58 e 15,36 para 24, 48, 72 e 96 horas. Os valores dos níveis de segurança foram 9,65; 2,81; 1,55 e 1,53 para 24, 48, 72 e 96 horas. No segundo capítulo observou-se que as larvas do camarão-da-amazônia demonstraram maior tolerância a exposição às diferentes concentrações de amônia total e nitrito em combinação, durante 96 horas, (efeito antagônico) do que quando submetidos a estes compostos isoladamente. No terceiro capítulo os níveis de toxicidade crônica de amônia total e nitrito não influenciaram significativamente nos valores de mortalidade, contudo, quando expostos ao dobro do nível de segurança dos compostos avaliados, pode-se observar um atraso no desenvolvimento larval de *M. amazonicum*. Esses resultados são importantes para produção de pós-larvas.

## REFERÊNCIAS

Boyd, C. E., 2020. *Water quality: an introduction*. Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-23335-8>

Chen, J. C., & Cheng, S. Y. (1995). Accumulation of urea in the haemolymph and ammonia excretion of *Penaeus japonicus* exposed to ambient nitrite. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 110(1), 1-6. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(94\)00084-N](https://doi.org/10.1016/0742-8413(94)00084-N)

Ciji, A., & Akhtar, M. S., 2020. Nitrite implications and its management strategies in aquaculture: A review. *Reviews in Aquaculture*, 12(2), 878-908. <https://doi.org/10.1111/raq.12354>

Dantas, D. P., Flickinger, D. L., Costa, G. A., Batlouni, S. R., Moraes-Valenti, P., & Valenti, W. C., 2020. Technical feasibility of integrating Amazon river prawn culture during the first phase of tambaqui grow-out in stagnant ponds, using nutrient-rich water. *Aquaculture*, 516, 734611. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734611>

Dantas, D. P., Flickinger, D. L., Costa, G. A., Moraes-Valenti, P., & Valenti, W. C., 2022. Economic effects of production scale, use of agricultural greenhouses, and integration of tropical aquaculture species when farming in a subtropical climate. *Aquaculture International*, 30(2), 547-579. <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00822-2>

De Queiroz, J. F., 2013. Boas práticas aquícolas (BPA) em viveiros garantem sucesso da produção. *Aquicultura*, p. 36.

Kır, M., Kumlu, M., & Eroldoğan, O. T. (2004). Effects of temperature on acute toxicity of ammonia to *Penaeus semisulcatus* juveniles. *Aquaculture*, 241(1-4), 479-489. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.05.003>

Dutra, F. M., Forneck, S. C., Brazão, C. C., Freire, C. A., & Ballester, E. L. C., 2016a. Acute toxicity of ammonia to various life stages of the Amazon river prawn, *Macrobrachium amazonicum*, Heller, 1862. *Aquaculture*, 453, 104-109. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.038>

Dutra, F. M., Freire, C. A., Vaz dos Santos, A. M., Forneck, S. C., Brazão, C. C., & Ballester, E. L. C., 2016b. Acute toxicity of nitrite to various life stages of the Amazon river prawn, *Macrobrachium amazonicum*, Heller, 1862. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 97(5), 619-625. <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1932-2>

- Gomes Jr, R. S., de Lima, J. P. V., Cavalli, R. O., & Correia, E. D. S., 2016. Acute toxicity of ammonia and nitrite to painted river prawn, *Macrobrachium carcinus*, larvae. *Journal of the World Aquaculture Society*, 47(2), 239-247. <https://doi.org/10.1111/jwas.12258>
- Maciel, C. R., & Valenti, W. C., 2009. Biology, fisheries, and aquaculture of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*: a review. *Nauplius*, 17(2), 61-79.
- Meiros, A. L., Valenti, W. C., & Mantelatto, F. L., 2013. Reproductive variability of the Amazon River prawn, *Macrobrachium amazonicum* (Caridea, Palaemonidae): influence of life cycle on egg production. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 41(4), 718-731. <https://doi.org/10.3856/vol41-issue4-fulltext-8>
- Moraes-Valenti P, Valenti WC, 2010. Culture of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*. In: New MB, Valenti WC, Tidwell JH, D'Abramo LR, Kutty MN (eds) *Freshwater prawns: biology and farming*. Wiley-Blackwell, Oxford, pp 485–501
- Mugnier, C., & Justou, C., 2004. Combined effect of external ammonia and molt stage on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* physiological response. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 309(1), 35-46. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.03.008>
- Rodrigues, C. G., Garcia, B. F., Verdegem, M., Santos, M. R., Amorim, R. V., & Valenti, W. C., 2019. Integrated culture of Nile tilapia and Amazon river prawn in stagnant ponds, using nutrient-rich water and substrates. *Aquaculture*, 503, 111-117. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.073>
- Romano, N., & Zeng, C., 2013. Toxic effects of ammonia, nitrite, and nitrate to decapod crustaceans: a review on factors influencing their toxicity, physiological consequences, and coping mechanisms. *Reviews in Fisheries Science*, 21(1), 1-21. <https://doi.org/10.1080/10641262.2012.753404>
- Tomasso, J. R., 1994. Toxicity of nitrogenous wastes to aquaculture animals. *Reviews in Fisheries Science*, 2(4), 291-314. <https://doi.org/10.1080/10641269409388560>
- Valenti W.C, Daniels, W. H, New, M. B, Correia, E. S., 2010. Hatchery Systems and Management. In: New MB, Valenti WC, Tidwell JH, D'Abramo LR, Kutty MN (eds) *Freshwater prawns: biology and farming*. Wiley-Blackwell, Oxford, pp 55–85

Xian, J. A., Wang, A. L., Chen, X. D., Gou, N. N., Miao, Y. T., Liao, S. A., & Ye, C. X. (2011). Cytotoxicity of nitrite on haemocytes of the tiger shrimp, *Penaeus monodon*, using flow cytometric analysis. *Aquaculture*, 317(1-4), 240-244. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.03.026>

Zagatto, P.A., Bertolotti, E., 2008. *Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações*. Rima, São Carlos.

Zhang, W., Jiang, Q., Liu, X., Pan, D., Yang, Y., & Yang, J., 2015. The effects of acute ammonia exposure on the immune response of juvenile freshwater prawn, *Macrobrachium nipponense*. *Journal of Crustacean Biology*, 35(1), 76-80. <https://doi.org/10.1163/1937240X-00002292>

## APÊNDICE

**Efeito crônico de amônia total e nitrito no consumo alimentar de pós-larvas do camarão-da-amazônia *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862)**

**RESUMO**

Os experimentos foram conduzidos para investigar os efeitos crônicos de amônia total e nitrito no consumo alimentar de pós-larvas de *Macrobrachium amazonicum*. Os animais com peso médio de 0.0625g foram aclimatados por 21 dias em diferentes concentrações de amônia total e nitrito. Após o período de exposição, 6 camarões por tratamento foram acomodados em unidades experimentais de 250 ml para analisar o consumo alimentar em função da quantidade de ração oferecida e das sobras durante um período de 24 horas. Foram determinadas alterações significativas ( $P < 0,05$ ) para o consumo alimentar dos camarões expostos a todas as concentrações de nitrito, e em concentrações de duas vezes o nível de segurança para amônia total. De acordo com os resultados obtidos, altas concentrações de amônia total, e nitrito, afetam o consumo alimentar de *M. amazonicum*. Portanto, a possibilidade de que isto ocorra por longos períodos, afetando negativamente as espécies em cativeiro, reforça a necessidade de uma gestão da qualidade da água.

**Palavras-chave:** qualidade da água, compostos nitrogenados, nutrição, aquicultura.

Parte dos dados deste Apêndice foram utilizados na publicação do artigo: “Effects of ammonia and nitrite on food consumption of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) postlarvae” em:

Latin American Journal of Aquatic Research, 49(4): 684-688, 2021  
DOI: 10.3856/vol49-issue4-fulltext-2583

## INTRODUÇÃO

O camarão-da-amazônia *Macrobrachium amazonicum* pertence ao grupo de espécies continentais de desenvolvimento larvar completo (Odinetz-Collart, 1993). Sua ocorrência foi revisada por Maciel e Valenti (2009) e é bem descrita para rios, lagos e planícies aluviais de regiões tropicais e subtropicais da América do Sul (Melo, 2003), sendo também muito comum em reservatórios no nordeste do Brasil e em rios da Amazônia, onde representa cerca de 80% da biomassa de macrocrustáceos em lagos de terras baixas (Odinetz-Collart e Moreira, 1993).

Fatores ambientais são considerados determinantes para o sucesso da produção em cativeiro de camarões, e *M. amazonicum* tem potencial para o produção em regiões subtropicais e tropicais. O desenvolvimento e o domínio das técnicas de aquicultura levaram à intensificação das culturas de diferentes espécies, e há uma tendência crescente na geração de compostos de nitrogenados nestes sistemas (Wasielesky, 2000).

Em sistemas fechados, especialmente em sistemas modernos de larvicultura, berçários e tanques de produção que utilizam recirculação de água e altas densidades de povoamento, o aumento de compostos inorgânicos, especialmente amônia total (Perfettini e Bianchi, 1990; Lin e Chen, 2001) e nitrito (Russo e Thurston, 1978; Furtado et al., 2016) são um risco potencial para a performance dos organismos criados. Esses compostos estão geralmente relacionados à mortalidade dos crustáceos nos sistemas de produção. Entretanto, mesmo que não causem mortalidade, quando em altas concentrações, podem afetar diretamente o crescimento e o consumo de ração (Tomasso, 1994; Campos et al., 2013; Maicá et al., 2018). De acordo com Kinne (1976), em qualquer sistema de criação, a manutenção do meio e o conhecimento dos limites de tolerância de uma espécie em relação à qualidade

da água são indispensáveis. De acordo com Ostrensky e Wasielesky (1995), tais fatores influenciam decisivamente o sucesso ou o fracasso da atividade produtiva.

Nos sistemas de criação, os resíduos de nitrogênio são poluentes comuns do meio ambiente, sendo a excreção de organismos e a degradação dos resíduos alimentares as principais fontes dessas substâncias. Os alimentos utilizados na aquicultura contêm altos níveis de proteína e, como esses alimentos são digeridos ou degradados, a liberação de compostos de nitrogênio aumenta (Tomasso, 1994). Os compostos nitrogenados ocorrem naturalmente no sistema aquático, porém, se as concentrações alcançarem níveis elevados, podem causar mortalidade ou afetar o crescimento de organismos cultivados (Thurston, 1980).

O conhecimento do consumo alimentar é fundamental para a gestão de fornecimento de ração, a fim de evitar uma administração excessiva de alimentos que comprometa a qualidade da água, bem como um fornecimento insuficiente de alimentos que afete o crescimento (Soares et al., 2005). Embora estudos tenham mostrado que o consumo alimentar varia de acordo com o peso do camarão, foram descritos diferentes resultados entre espécies e condições experimentais, tais como a diminuição ou aumento da taxa alimentar com o crescimento (González-Peña et al., 2002; Campos et al., 2013; Maicá et al., 2018).

Como forma de reduzir os gastos com ração e manter a qualidade adequada da água para o desenvolvimento de organismos de criação, muitas fazendas de camarão têm usado bandejas de ração, em vez de alimentar todo o plantel guiadas por tabelas de arrazoamento. Entretanto, tal prática não impede que a qualidade da água seja prejudicada e, em ambos os casos, é essencial saber como a qualidade da água influencia o consumo de alimento dos camarões (Wasielesky et al., 2003).

## MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Carcinicultura localizado na Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, e os organismos foram fornecidos pelo Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP/ Jaboticabal.

O experimento com as pós-larvas foi realizado em unidades experimentais com volume útil de 10 litros, sendo fornecido aeração constante, substrato (para reduzir o comportamento agonístico) e fotoperíodo 12:12, em sala climatizada.

A água utilizada foi oriunda de abastecimento público, devidamente desclorada. Doze animais ( $0.0625\text{g} \pm 0.02$ ) da espécie *M. amazonicum* foram estocados em cada unidade experimental por três semanas em um sistema randomizado com quatro tratamentos e quatro réplicas. Os animais eram alimentados duas vezes ao dia com uma taxa de arraçoamento de 10% da biomassa com ração comercial Poti Mirim QS 40 J; Guabi® - 40% proteína bruta. Os camarões foram expostos a quatro concentrações de amônia total (0, 1.05, 2.1 e 4.2  $\text{mg.L}^{-1}$ ) e quatro concentrações de nitrito (0, 0.075, 0.15 and 0.30  $\text{mg.L}^{-1}$ ). Esses valores correspondem a um controle, metade do nível de segurança, o nível de segurança e o dobro do nível de segurança como determinado por Dutra et al. (2016a) e Dutra et al. (2016b) (Tabela 1).

Tabela 1 - Tratamentos aplicados a pós-larvas de *Macrobrachium amazonicum* para analisar o consumo de ração em função das concentrações (média  $\pm$  desvio padrão) de amônia total (A, B e C) e nitrito (D, E e F) utilizadas nos experimentos. Os valores são apresentados em ordem crescente e de acordo com a metade do nível de segurança (N.S.), o N.S. e duas vezes o N.S

Composto	Tratamento	Concentração (mg/L <sup>-1</sup> )
Controle	-	-
	-	-
	-	-
Amônia total	A	1,05 $\pm$ 0,12
	B	2,11 $\pm$ 0,07
	C	4,23 $\pm$ 0,08
Nitrito	D	0,075 $\pm$ 0,10
	E	0,15 $\pm$ 0,11
	F	0,30 $\pm$ 0,26

As concentrações de amônia total e nitrito foram preparadas por meio de soluções estoques individuais (1.000 mg.L<sup>-1</sup> de amônia total; 50 mg.L<sup>-1</sup> de nitrito), obtidas pelas diluições de 3,819 g.L<sup>-1</sup> de cloreto de amônio P. A. (êxodo científica®) e 1,232 g.L<sup>-1</sup> de nitrito de sódio P. A. (êxodo científica®), respectivamente. As soluções estoques foram devidamente diluídas em cada unidade experimental para obtenção das concentrações desejadas. Para manter as concentrações, 100% do volume dos tanques foi renovado a cada três dias e as soluções foram adicionadas novamente para manutenção das concentrações experimentais, adaptando a metodologia proposta por Melo et al., 2016. As unidades experimentais foram sifonadas diariamente para remoções de sobra de ração e fezes. As pós-larvas de *M. amazonicum* foram contadas, pesadas e medidas no início e ao final do experimento para avaliação da performance

zootécnica. Sobrevivência (%), peso total (g) e comprimento (cm) foram avaliados.

Os parâmetros de qualidade de água como oxigênio dissolvido e temperatura (HANNA HI9146) e pH (LUCAMEDA LUCA-210) foram aferidos diariamente. A determinação das concentrações de amônia total e nitrito foram realizadas a partir de amostras coletadas em cada troca de solução. A amônia total foi avaliada pelo método de Koroleff (1976) e nitrito foi analisado pelo método de Reação de Griess (Baumgarten, 1996).

Após o período de exposição crônica, 6 camarões por tratamento foram selecionados aleatoriamente e acomodados em unidades experimentais de 250 ml, com as respectivas soluções de compostos nitrogenados. para analisar o consumo alimentar em função da quantidade de ração oferecida e das sobras. Nessas unidades, os animais foram mantidos por 24 horas sem alimentação. Após esse tempo, a água foi completamente renovada e iniciou-se a alimentação com ração pesada previamente. Após 24 horas, foi realizado o sifonamento e a filtragem em malha de 30  $\mu$ m, que posteriormente foi lavada para eliminação das fezes. Os restos de alimentação foram raspados e colocados em papel laminado e depois secos em estufa a 60°C até atingirem peso constante. Para determinar o percentual de matéria seca, foram utilizadas 5 amostras de peso conhecido em um forno a 60°C, até atingir peso constante, utilizando uma balança eletrônica digital (AY220, Marte®) com precisão de 0,01 g. As amostras foram pesadas novamente e a umidade foi determinada pela diferença entre o peso da ração antes e depois da secagem em estufa. Para a determinação da lixiviação, o teste branco foi realizado com 5 amostras, sem camarão e com aeração constante.

Foi utilizado um peso de ração conhecido, e após 24h, os meios experimentais foram sifonados e filtrados através de uma malha de 30 µm. Os restos da alimentação foram raspados e colocados em papel laminado e depois em forno a 60°C até atingir peso constante. O consumo de matéria seca de cada camarão foi baseado na diferença entre o que foi alimentado e as sobras, levando em conta o teor de umidade inicial, a lixiviação da ração e as perdas no processo de sifonagem e lavagem. O consumo de matéria seca foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{CMS} = ((R_{\text{fornecida}} \times 0.928) - R_{\text{seca}}) \times 0.55 / \text{peso do camarão}$$

onde:

CMS = consumo de matéria seca (g de ração / g do camarão / dia);

R<sub>fornecida</sub> = quantidade de ração fornecida;

0.928 = 92.8% = conteúdo inicial de matéria seca da ração;

R<sub>seca</sub> = quantidade de ração após a secagem;

0.55 = 55.0% = porcentagem de material seco após o teste branco (sem camarão), referindo-se a perdas com solubilidade da ração e a metodologia utilizada (sifonagem e lavagem).

Os dados sobre a qualidade da água e parâmetros de desempenho zootécnico obtidos nos diferentes tratamentos foram submetidos à análise de variância ANOVA, levando em conta os pressupostos necessários. Quando foram detectadas diferenças significativas ( $P < 0,05$ ), foi aplicado o teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Os valores percentuais de sobrevivência foram transformados (arco de raiz quadrada) antes de serem analisados (Zar, 1996).

## RESULTADOS

As concentrações de amônia total e nitrito permaneceram próximas às concentrações desejadas para o teste de toxicidade crônica. As outras variáveis de qualidade da água permaneceram dentro dos padrões recomendados para as espécies durante todo o período experimental (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores médios de amônia total e nitrito, pH, temperatura (° C) e oxigênio dissolvido (mg / L) durante os 21 dias de experiência. Os dados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão.

Amônia total (Valor Esperado)	Amônia total (Valor de Leitura)	pH	Temperatura	Oxigênio Dissolvido
0.0	0.029 $\pm$ 0.029	8.17 $\pm$ 0.08	27.3 $\pm$ 1.2	7.3 $\pm$ 0.4
1.05	1.22 $\pm$ 0.23	8.18 $\pm$ 0.09	27.4 $\pm$ 1.1	7.2 $\pm$ 0.4
2.1	2.11 $\pm$ 0.37	8.13 $\pm$ 0.09	27.4 $\pm$ 1.1	7.2 $\pm$ 0.3
4.2	4.07 $\pm$ 0.92	8.15 $\pm$ 0.13	27.6 $\pm$ 1.3	7.1 $\pm$ 0.4
Nitrito (Valor Esperado)	Nitrito (Valor de Leitura)	pH	Temperatura	Oxigênio Dissolvido
0.0	0.02 $\pm$ 0.023	8.32 $\pm$ 0.09	24.2 $\pm$ 1.2	6.9 $\pm$ 0.3
0.075	0.083 $\pm$ 0.011	8.31 $\pm$ 0.09	24.3 $\pm$ 1.2	7.0 $\pm$ 0.3
0.15	0.15 $\pm$ 0.014	8.28 $\pm$ 0.09	24.3 $\pm$ 1.2	6.9 $\pm$ 0.3
0.30	0.30 $\pm$ 0.031	8.24 $\pm$ 0.11	24.3 $\pm$ 1.2	6.9 $\pm$ 0.3

Os pesos inicial e final dos camarões submetidos as diferentes concentrações de amônia total e nitrito não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ). Os parâmetros de desempenho zootécnico podem ser visualizados na tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros de desempenho zootécnico obtidos nos diferentes tratamentos ao final de 21 dias de exposição crônica. Os dados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão de sobrevivência (%), peso final (g) e comprimento total (cm). Diferentes letras sobrepostas na mesma coluna indicam meios estatisticamente diferentes (tratamento x controle) ( $p < 0,05$ ).

Amônia total	Sobrevivência (%)	Peso (g)	Comprimento (cm)
0.0	56.25 <sup>a</sup>	0.060 $\pm$ 0,015	1.19 $\pm$ 0.17
1.05	58.33 <sup>a</sup>	0.070 $\pm$ 0,020	2.1 $\pm$ 0.20
2.1	16.66 <sup>b</sup>	0.054 $\pm$ 0,017	1.9 $\pm$ 0.22
4.2	6.25 <sup>c</sup>	0.066 $\pm$ 0,025	2.1 $\pm$ 0.36

Nitrito	Sobrevivência (%)	Peso (g)	Comprimento (cm)
0.0	72.2 <sup>b</sup>	0.052 $\pm$ 0.026	1.9 $\pm$ 0.3
0.075	61.1 <sup>b</sup>	0.050 $\pm$ 0.016	1.9 $\pm$ 0.2
0.15	88.8 <sup>a</sup>	0.046 $\pm$ 0.017	1.9 $\pm$ 0.2
0.30	5.5 <sup>c</sup>	0.064 $\pm$ 0.001	2.1 $\pm$ 0.1

O consumo de ração por pós-larvas de *M. amazonicum* variou de 0,0133 a 0,0181g/g/dia (Fig. 1a) e foi afetado pela maior concentração de amônia total, sendo o tratamento C significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) dos outros. Para animais expostos a nitrito, o consumo de ração variou de 0,0077 a 0,0169g/g/dia e foi significativamente afetado ( $P < 0,05$ ) nos tratamentos D, E e F, quando comparado ao controle, o tratamento F foi significativamente diferente dos tratamentos D e E (Fig. 1b).

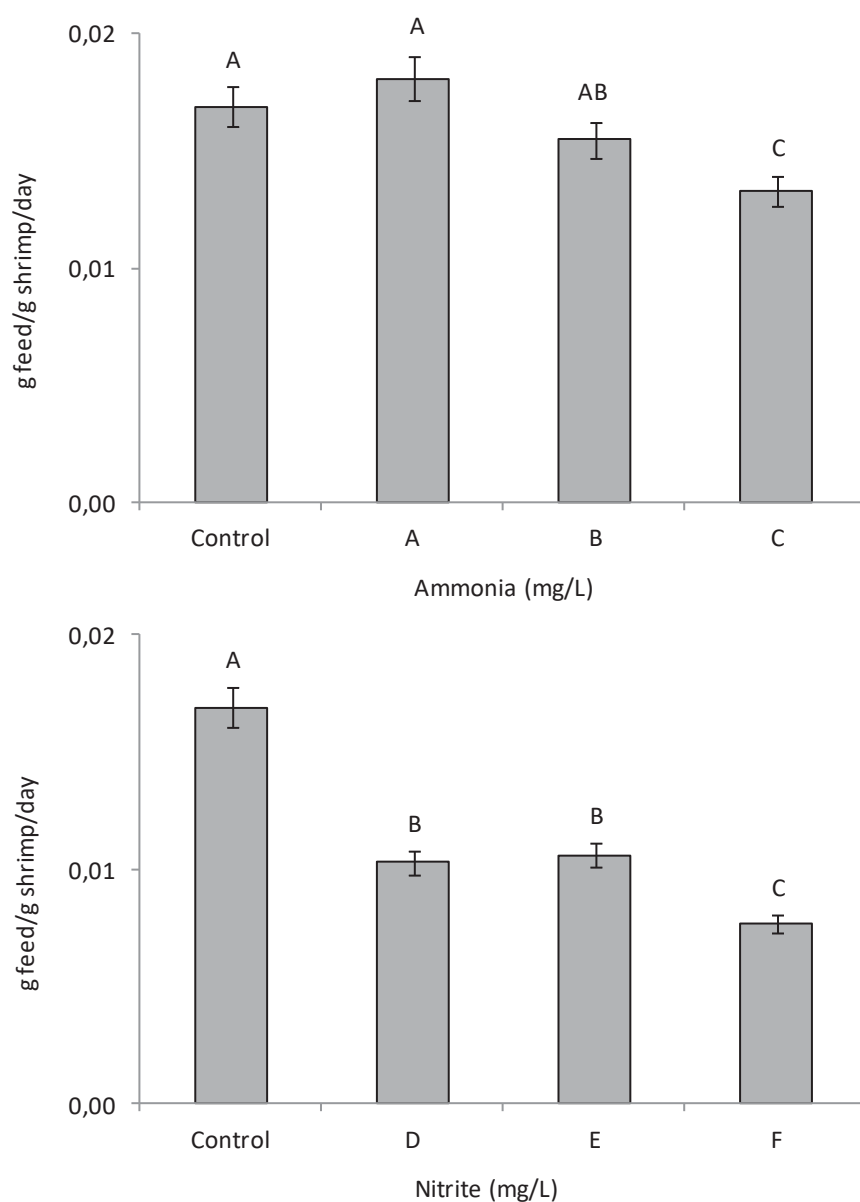


Fig. 1 - Consumo alimentar de pós-larvas de *M. amazonicum* em diferentes concentrações de amônia total (A, B e C) (a) e nitrito (D, E e F) (b). Os dados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais indicam meios estatisticamente iguais entre eles ( $p > 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

Pode-se observar uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos valores de sobrevivência das pós-larvas de *M. amazonicum* submetidos as concentrações sub-letais de amônia total e nitrito. Para amônia total os melhores resultados foram observados no controle e no tratamento que representava a metade do nível de segurança. Já o nível de segurança e o dobro do nível de segurança apresentaram sobrevivências inferiores a 20%. Já em nitrito o melhor resultado foi observado na dose que representava o nível de segurança, seguido pelo controle, metade do nível de segurança e o dobro do nível de segurança, sendo que somente o último apresentou sobrevivência inferior à 60%. Em ambos os casos há uma mortalidade muito grande quando submetidos ao dobro do nível de segurança, sendo esse o pior tratamento. Para peso e comprimento não foram observados diferenças significativas, contudo, os resultados encontrados mostram a importância de realizar experimentos de efeito crônico de níveis sub-letais, fato este confirmado pelos resultados encontrados nos testes de consumo alimentar.

Em altas concentrações, os compostos nitrogenados (amônia, nitrito e nitrato) afetam os processos fisiológicos dos organismos cultivados. Entre esses processos, a osmoregulação e a respiração podem ser afetadas, resultando em baixo consumo de alimentos, baixa taxa de crescimento específico ou mesmo mortalidade do camarão. (Kuhn et al., 2010, Furtado et al., 2016). No período de muda, os camarões são mais sensíveis às diferentes ações dos compostos nitrogenados e, por essa razão, os animais que estavam na muda foram desconsiderados na avaliação do consumo de alimentos.

Para amônia total os efeitos adversos sobre o consumo de ração só foram observados com concentrações de duas vezes o nível de segurança da espécie *M. amazonicum*. Os efeitos tóxicos da amônia em pós-larvas são observados em várias espécies de camarão, com poucos estudos relatando os efeitos sobre o *M. amazonicum* (Dutra et al., 2016).

Pesquisas prévias com outras espécies mostraram um desenvolvimento reduzido (Mallasen e Valenti, 2005), aumento da taxa de mortalidade (Ostrensky

e Wasielesky, 1995) e mudanças nos processos fisiológicos, como o aumento do consumo de oxigênio (Barbieri, 2010) na excreção de nitrogênio (Romano e Zeng, 2013). Wasielesky et al. (2003) em estudos com camarão marinho *Farfantepenaeus paulensis*, não encontraram efeitos adversos no consumo de alimentos, expondo o camarão por um período de 15 dias a concentrações de 0,91, 3,65 e 7,30 mg/l de amônia total. Isto pode estar relacionado com o tempo de exposição do camarão. Por outro lado, Miranda-Filho et al. (2009) analisando o efeito da amônia sobre os juvenis da mesma espécie nas fases pós-larvas e de juvenis durante 75 dias, observaram uma redução na atividade de predação e crescimento.

Em estudos com o camarão rosa *F. paulensis*, Wasielesky et al. (2003) observaram uma relação negativa entre as concentrações de nitrito e o consumo de alimentos, mesmo com apenas 15 dias de exposição. Segundo os autores, a ação do nitrito sobre os pigmentos respiratórios e a capacidade de absorção e transporte de oxigênio na hemolinfa poderia ser responsável pela diminuição das taxas de consumo de alimentos, já que reduziriam o metabolismo aeróbico dos camarões. O estudo de consumo alimentar é importante para a sobrevivência e crescimento, pois em condições adversas, como organismos submetidos a níveis mais elevados de compostos nitrogenados, a maior parte da energia proveniente dos alimentos pode ser canalizada para a manutenção do metabolismo e sobrevivência, enquanto uma parte menor estaria disponível para reprodução (Wong et al., 1993). Portanto, com o menor consumo de alimentos, causado por produtos nitrogenados, por exemplo, as taxas de crescimento podem ser comprometidas e a produtividade também, resultando em perdas financeiras para os produtores.

## CONCLUSÃO

Os compostos nitrogenados, como descritos neste experimento, afetaram a sobrevivência e as taxas de consumo de ração de *M. amazonicum*. Com o menor consumo, a taxa de crescimento específico diminuiu, afetando diretamente a produtividade final.

## REFERÊNCIAS

- APHA – American Public Health Association. 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21th ed. APHA, Washington D.C.
- Barbieri, E., 2010. Acute toxicity of ammonia in white shrimp (*Litopenaeus schmitti*) (Burkenroad, 1936, Crustacea) at different salinity levels. *Aquaculture* 306, 329–333 (Burkenroad, 1936, Crustacea at different salinity levels).
- Baumgarten, M.G.Z.; Wallner-Kersanach, M. & Niencheski, L.F. Manual de Análises em Oceanografia Química. Rio Grande : ed.: Editora da FURG, 2010. 172p.
- Campos BR, Furtado PS, D’Incao F, Wasielesky W, Poersch LHS. 2013. Nitrogen compounds on food consumption of pink-shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis*. *Cienc Rur.* 43:2202–2207.
- Coler, R.A., Watanabe, T., Xavier, B.F., Paz, R.J., 1999. A preliminary report on the application of *Macrobrachium amazonicum* Heller, 1862 (Decapoda: Palaemonidae) as a biomarker. *Hydrobiologia* 412, 119–121.
- Dutra FM; Forneck SC; Brazão CC; Freire CA & Ballester ELC. 2016. Acute toxicity of ammonia to various life stages of the Amazon river prawn, *Macrobrachium amazonicum*, Heller, 1862. *Aquaculture (Amsterdam)*, v. 453, p. 104-109.
- Furtado, P.S.; Valenzuela, M.A.J.; Rodriguez-Fuentes, G.; Campos, B.R.; Wasielesky, W. Jr. & Gaxiola, G. 2016. Chronic effect of nitrite on the rearing of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* in two salinities, *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 49:3, 201-211.
- González-Peña, M.C. et al. Effects of dietary fiber on growth and gastric emptying time of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). *Journal of the World Aquaculture Society*, v.33, p.441-447, 2002.
- Kinne O. 1976. *Marine Ecology*, John Wiley and Sons, New York, NY, 577 pp.

- Kuhn, D.D.; Smith, S.A.; Boardman, G.D.; Angier, M.W.; Marsh, L. & Flick Jr. G.J. Chronic toxicity of nitrate to Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Impacts on survival, growth, antennae length, and pathology. *Aquaculture*, v.309, p. 109-114, 2010.
- Lin YC, Chen JC. 2001. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. *J Exp Mar Biol Ecol.* 259:109–119.
- Lopes DA; Peixoto, SEM; Wasielesky W & Ballester ELC. 2009. Análise comparativa da criação dos camarões-rosa *Farfantepenaeus brasiliensis* e *Farfantepenaeus paulensis* criados em gaiolas em ambiente estuarino. *Ciência Rural* (UFMS. Impresso). 39: 1540-1546.
- Maciél CR & Valenti WC. 2009. Biology, Fisheries, and Aquaculture of the Amazon River Prawn *Macrobrachium amazonicum*: A Review. *Nauplius*, v. 17(2). P. 61-79.
- Maicá, P.F.; Furtado, P.S.; Martins, A.C.S.; Miranda-Filho, K.C & Wasielesky Junior, W. 2018. Effect of alkalinity on food consumption of juvenile pacific white shrimp reared in clear water and biofloc system. *Bol. Inst. Pesca* 2018, 44(2).
- Mallasen, M., Valenti, W.C., 2005. Larval development of the giant river prawn *Macrobrachium rosenbergii* at different ammonia concentrations and pH values. *J. World Aquacult. Soc.* 36, 32–41.
- Melo GAS. 2003. Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil. São Paulo, Editora Loyola, 430 p.
- Miranda-Filho, K.C. Pinho, G.L.L.; Wasielesky, W.F.B.; Bianchini, A. Long-term ammonia toxicity to the pink-shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, v.150, p.377-382, 2009.
- New, M.B., 2002. Farming Freshwater Prawns: A Manual for the Culture of the Giant River Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). FAO Fisheries Technical Paper, Rome, p. 212.

- Odinetz-Collart O & Moreira LC. 1993. Potencial pesqueiro do camarão *Macrobrachium amazonicum* na Amazônia Central (Ilha do Careiro). *Amazoniana*, Manaus, v.12 (3/4). p.399-413.
- Ostrensky, A., Wasielesky Jr., W., 1995. Acute toxicity of ammonia to various life stages of the São Paulo shrimp, *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967. *Aquaculture* 132, 339–347.
- Ostrensky A & Wasielesky W. 1995. Acute toxicity of ammonia to various life stages of the São Paulo shrimp *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967. *Aquaculture*. 132: 339-347.
- Perfettini J & Bianchi M. 1990. The comparison of two simple protocols designed to nitrite and stimulate ammonia oxidation in closed aquaculture systems. *Aquaculture*, 88: 179-188.
- Romano, N., Zeng, C., 2013. Toxic effects of ammonia, nitrite and nitrate to Decapod Crustaceans: a review on factors influencing their toxicity, physiological consequences and coping mechanisms. *Rev. Fish. Sci.* 21, 1–21.
- Russo RC & Thurston RV. 1978. Ammonia and nitrite toxicity to fishes. Duluth, EPA-600/3-78-076.
- Sampaio, C.M.S., Silva, R.R., Santos, J.A., Sales, S.P., 2007. Reproductive cycle of *Macrobrachium amazonicum* females (Crustacea, Palaemonidae). *Braz. J. Biol.* 67, 551–559.
- Soares, R., Wasielesky, W., Peixoto, S. & D’Incao, F. Food consumption and gastric emptying of *Farfantepenaeus paulensis*. *Aquaculture*, v.250, p.283-290, 2005.
- Tomasso JR. 1994. Toxicity of nitrogenous wastes to aquaculture animals. *Reviews in Fisheries Science*, 2(4):291-314.
- Thurston RV. 1980. Some factor affecting the toxicity of ammonia to fishes. *EPA Ecol. Res. Ser.*, EPA-600/9-80-034: 118-137.

- Vasquez, O.E., Rouse, D.B., Rogers, W.A., 2007. Growth response of *Macrobrachium rosenbergii* to different levels of hardness. *J. World Aquacult. Soc.* 20, 90–92.
- Wasielesky W. 2000. Cultivo de juvenis do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Decapoda, Penaeidae) no estuário da Lagoa dos Patos: Efeitos dos parâmetros ambientais. Tese de doutorado. Fundação Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, RS, 199p.
- Wasielesky, W.; Bianchini, A; Castaño Sanchez, C & Poersch, L.H. 2003. The effect of temperature, salinity and nitrogen products on food consumption of pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.46, p.135– 141.
- Wong, C.K.; Chu, K.H.; Tang, K.W.; Tam, T.W. & Wong, L.J. Effects of chromium, copper and nickel on survival and feeding behaviour of *Metapenaeus* larvae and postlarvae (Decapode:Penaeidae). *Marine Environmental Research*, v.36, p.63-78, 1993.
- Zar JH. 1996. *Biostatistical analysis*. 3.ed. New Jersey: Prentice Hall. pp. 662.