

RIVALDO SIQUEIRA GOMES JUNIOR

TOXICIDADE AGUDA DA AMÔNIA E NITRITO EM LARVAS DE PITU
Macrobrachium carcinus (LINNAEUS, 1758)

Recife
Abril/2014



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA

TOXICIDADE AGUDA DA AMÔNIA E NITRITO EM LARVAS DE PITU
Macrobrachium carcinus (LINNAEUS, 1758)

Rivaldo Siqueira Gomes Junior

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco como exigência parcial para obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Eudes de Souza Correia
Orientador

Recife
Abril/2014

Ficha catalográfica

G633t Gomes Junior, Rivaldo Siqueira
Toxicidade aguda da amônia e nitrito em larvas de pitu
Macrobrachium carcinus (Linnaeus, 1758) / Rivaldo Siqueira
Gomes Junior. – Recife, 2014.
61 f. : il.

Orientador: Eudes de Souza Correia.
Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e
Aquicultura) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Departamento de Pesca e Aquicultura, Recife, 2014.
Inclui referências, anexo(s) e apêndice(s).

1. *Macrobrachium carcinus* 2. Zoea 3. Amôni 4. Nitrito
5. Toxicidade aguda I. Correia, Eudes de Souza,
orientador II. Título

CDD 639

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA

TOXICIDADE AGUDA DA AMÔNIA E NITRITO EM LARVAS DE PITU
Macrobrachium carcinus (LINNAEUS, 1758)

Rivaldo Siqueira Gomes Junior

Dissertação julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Aquicultura. Defendida e aprovada em 28/04/2014 pela seguinte Banca Examinadora.

Prof. Dr. Eudes de Souza Correia

(Orientador)

[Departamento de Pesca e Aquicultura]

[Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE]

Prof. Dr. Alfredo Olivera Gálvez

[Departamento de Pesca e Aquicultura]

[Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE]

Prof. Dr. Paulo de Paula Mendes

[Departamento de Pesca e Aquicultura]

[Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE]

Prof. Dr. Petrônio Alves Coelho Filho

[Curso de Engenharia de Pesca, Unidade de Penedo]

[Universidade Federal de Alagoas - UFAL]

Prof. Dr. William Severi

[Departamento de Pesca e Aquicultura]

[Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE]

Dedicatória

*Em primeiro lugar a Deus, a minha família e amigos,
tão maravilhosos, os quais eu amo muito.*

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, por sua graça e misericórdia em todos os momentos da minha vida e por iluminar os meus passos durante a realização deste projeto.

Aos meus avós Luiz Pereira Lins e Maria Pereira Lins, aos pais Rivaldo Siqueira Gomes e Ana Lins de Siqueira Gomes, os quais foram essenciais para formação do meu caráter, proporcionando muito amor, carinho e educação, desde os primeiros dias de minha vida. A meus irmãos, Nandejara Lins, Rildo Iaponã e a todos os familiares que participaram direta e indiretamente de minha formação moral e acadêmica. A minha esposa Layla Falcão Maciel e meu filho Gabriel Henrique por todo amor, carinho e companheirismo.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura pela oportunidade de obtenção do título de Mestre. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Pós-Graduação. À Estação de Aquicultura Continental Professor Johei Koike por toda a infraestrutura disponibilizada. A todos os professores, pelo aprendizado e trocas de experiência durante o tempo de formação.

Em especial ao professor e orientador Dr. Eudes de Souza Correia que, desde a época da graduação, confiou e me deu a oportunidade de aprender um pouco de todo seu conhecimento sobre aquicultura, contribuindo assim para minha formação profissional.

Ao professor Dr. Ronaldo O. Cavalli por seus esclarecimentos, sugestões e críticas referentes à metodologia experimental e colaboração no artigo.

Aos membros da banca Dr. Alfredo O. Gálvez, Dr. Paulo de Paula Mendes, Dr. Petrônio Alves Coelho Filho e Dr. William Severi pelas críticas e sugestões, que contribuíram para enriquecer esta dissertação.

Aos colegas do Laboratório de Sistemas de Produção Aquícola (LAPAq), Ugo Lima, Bruna Larissa, Fabiana Penalva, Maria Gabriela Ferreira, Xélem Wambach, Marcony Vasconcelos, Felipe Kássio, Eduardo Lima, Daniel Gregório, Diego Ferreira, Pedro Vinícius e Reginaldo Carneiro, por momentos de descontração, amizade e, principalmente, trocas de conhecimento científico. Em especial a João Paulo Lima, Éverton Pires, Rodolfo de Paula, Bruno Lucio, Rafael Liano e Johnson Liu, os quais foram imprescindíveis para execução deste trabalho.

Enfim, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta na minha formação acadêmica e na realização desta dissertação.

Resumo

A amônia requer atenção especial durante o processo de cultivo de várias espécies, pois pode acumular ao longo do tempo, devido principalmente, à decomposição dos compostos orgânicos e a excreção branquial dos animais cultivados, acarretando retardo no crescimento dos camarões e em níveis elevados podem causar morte. O processo de nitrificação possibilita converter a amônia em nitrato, onde o nitrito é um produto intermediário. Se a conversão para nitrato for obstruída, concentrações significativas de nitrito podem se acumular no ambiente. Nessas condições as larvas podem ser submetidas a elevadas concentrações de nitrito, composto altamente tóxico aos organismos aquáticos. O presente estudo avaliou a toxicidade de amônia e nitrito em três diferentes estágios larvais do camarão pitu, *Macrobrachium carcinus*, e estimou os níveis seguros destes compostos durante a fase de larvicultura. Três grupos replicados de larvas no estágio zoea II, V e VIII (denominados respectivamente de Z₂, Z₅ e Z₈) foram expostos separadamente a cinco concentrações de amônia (5, 10, 20, 40 e 80 mg NAT L⁻¹) e seis de nitrito (5, 10, 20, 40, 80 e 160 mg N-NO₂ L⁻¹), além de um tratamento controle sem amônia e nitrito, em salinidade de 20 g L⁻¹. Os valores de CL₅₀ em 96 h de Z₂, Z₅ e Z₈ foram 8,34, 13,84 e 15,03 mg NAT L⁻¹ (0,50, 0,71 e 0,92 mg N-NH₃ L⁻¹) e 3,28, 9,73 e 34,00 mg N-NO₂ L⁻¹, respectivamente. As CL₅₀ estimadas para N-NO₂ foram menores do que as de NAT na maior parte dos estágios avaliados. Isto sugere que as larvas de *M. carcinus* são mais tolerantes à amônia, exceto no Z₈, onde as larvas apresentaram uma maior resistência ao nitrito. Com base nas concentrações letais em 96 h, pode-se concluir que a tolerância das larvas de *M. carcinus* à amônia e nitrito aumenta com o desenvolvimento larval e os níveis de segurança foram estimados em 0,834 mg L⁻¹ de NAT (0,05 mg N-NH₃ L⁻¹) e 0,328 mg N-NO₂ L⁻¹, para todo o processo de larvicultura do *M. carcinus*.

Palavras-chave: *Macrobrachium carcinus*; zoea; amônia; nitrito; toxicidade aguda

Abstract

The ammonia requires special attention during the culturing process of several species, as it may accumulate over time, mainly due to the decomposition of organic compounds and gill excretion of the cultured animals, resulting in growth retardation of shrimps and at high levels can cause death. The nitrification process enables to convert ammonia to nitrate, where nitrite is an intermediate product. If the conversion to nitrate is blocked, significant concentrations of nitrite may accumulate in the environment. Under these conditions the larvae can be exposed to high concentrations of nitrite, compound highly toxic to aquatic organisms. The present study evaluated the toxicity to ammonia and nitrite to three different larval stages of the painted river prawn, *Macrobrachium carcinus*, and estimated the safe levels of these compounds during the hatchery phase. Three replicated groups of larvae in the zoea stages II, V and VIII (hence named Z₂, Z₅ and Z₈, respectively) were exposed separately to five ammonia (5, 10, 20, 40 and 80 mg TAN L⁻¹) and six nitrite concentrations (5, 10, 20, 40, 80 and 160 mg NO₂-N L⁻¹), plus a control treatment with no addition of ammonia and nitrite, at the salinity of 20 g L⁻¹. The LC₅₀ values at 96 h for Z₂, Z₅ and Z₈ were 8.34, 15.03 and 13.84 mg TAN L⁻¹ (0.50, 0.71 and 0.92 mg NH₃-N L⁻¹) and 3.28, 9.73 and 34.00 mg NO₂-N L⁻¹, respectively. The estimated LC₅₀ for NO₂-N were lower than those for TAN in most stages evaluated. This suggests that *M. carcinus* larvae are more tolerant to ammonia, except for Z₈, where larvae had a higher tolerance to nitrite. Based on the lethal concentrations at 96 h, it may be concluded that the tolerance of *M. carcinus* to ammonia and nitrite increases with larval development and safe levels were estimated to be 0.834 mg TAN L⁻¹ (0.05 mg NH₃-N L⁻¹) and 0.328 mg NO₂-N L⁻¹, for the entire process of larvae rearing of *M. carcinus*.

Keywords: *Macrobrachium carcinus*; zoea; ammonia; nitrite; acute toxicity

Lista de figuras

	Página
Figura 1. Distribuição do <i>Macrobrachium carcinus</i> no Brasil	15
Figura 2. Imagens das principais características dos estágios larvais do <i>Macrobrachium carcinus</i> baseadas em Coelho et al. (1982).	19

ARTIGO

	Página
Figura 1. Média (\pm DP) da mortalidade cumulativa (%) de larvas de <i>Macrobrachium carcinus</i> em fases Z_2 (A), Z_5 (B) e Z_8 (C) expostas a concentrações crescentes de nitrogênio da amônia total durante 24, 48, 72 e 96 h. Letras distintas no mesmo período de exposição indicam diferença significativa ($P < 0,05$)..	54
Figura 2. Média (\pm DP) da mortalidade cumulativa (%) de larvas de <i>Macrobrachium carcinus</i> em fases Z_2 (A), Z_5 (B) e Z_8 (C) expostas a concentrações crescentes de nitrogênio do nitrito durante 24, 48, 72 e 96 h. Letras distintas no mesmo período de exposição indicam diferença significativa ($P < 0,05$)..	55

Lista de tabelas

Página

- Tabelas 1.** Valores médios (\pm DP) das variáveis físico-químicas em unidades experimentais contendo larvas de *Macrobrachium carcinus* de diferentes estágios (Z_2 - Zoea II; Z_5 - Zoea V; Z_8 - Zoea VIII) expostos a concentrações crescentes de nitrogênio da amônia total (NAT) e do nitrito (N-NO₂), durante 96 horas. 50
- Tabelas 2.** Concentração letal média (CL₅₀; mg L⁻¹) e intervalos de confiança de 95% (entre parênteses) de nitrogênio da amônia total (NAT) e da amônia não ionizada (N-NH₃) estimados para diferentes estágios larvais (Z_2 - Zoea II; Z_5 - zoea V; Z_8 - zoea VIII) de *Macrobrachium carcinus* após 24, 48, 72 e 96 h de exposição 51
- Tabela 3.** Concentração letal média (CL₅₀; mg L⁻¹) e intervalos de confiança de 95% (entre parênteses) de nitrogênio do nitrito (N-NO₂) estimado para diferentes estágios larvais (Z_2 - Zoea II; Z_5 - zoea V; Z_8 - zoea VIII) de *Macrobrachium carcinus* após 24, 48, 72 e 96 h de exposição..... 52
- Tabela 4.** Concentração letal (CL₅₀; mg L⁻¹) e níveis seguros (mg L⁻¹) de nitrogênio da amônia total (NAT) e do nitrito (N-NO₂) estimados para diferentes estágios larvais de várias espécies de crustáceos..... 53

Sumário

Página

Dedicatória

Agradecimentos

Resumo

Abstract

Lista de figuras

Lista de tabelas

1- Introdução	12
2- Revisão de literatura.....	14
2.1- Característica da espécie	14
2.2- Distribuição geográfica	15
2.3- Morfologia e sistemática	16
2.4- Reprodução	17
2.5- Desenvolvimento larval.....	18
2.6- Sistema de cultivo	18
2.7- Alimentação	20
2.8- Compostos nitrogenados	21
3- Referências bibliográficas	23
4- Artigo científico	30
4.1- Normas da Revista [Aquaculture Research]	56

1- Introdução

No Brasil, o *Macrobrachium carcinus* (LINNAEUS, 1758) é uma das três espécies nativas, de camarão de água doce, com real valor econômico. As demais são *Macrobrachium acanthurus* (WEIGMANN, 1836) e *Macrobrachium amazonicum* (HELLER, 1862), todas com grande potencial para aquicultura e bastante explorada pela pesca artesanal.

Há vários anos o “pitu” *M. carcinus* tem sido alvo constante da exploração comercial da pesca artesanal em diversos países (LING e COSTELLO, 1979; MONTENEGRO et al., 2001). Nas décadas de 80 e 90, as capturas desta espécie declinaram significativamente, devido principalmente à poluição, destruição dos ecossistemas naturais e à sobrepesca (VALENTI, 1993; HERMAN et al., 1999; BOWLES et al., 2000).

Atualmente, o *M. carcinus* encontra-se na lista oficial de espécies ameaçadas de extinção e tem a pesca proibida conforme Instrução Normativa do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, 2004). Neste contexto, a aquicultura surge como uma alternativa para suprir a demanda desse crustáceo e como meio de preservação da espécie por meio de iniciativas de repovoamento.

A grande problemática na produção de pós-larvas de pitu está no seu longo desenvolvimento larval e comportamento agressivo, que acarretam uma baixa sobrevivência e produtividade. Para o cultivo possui várias vantagens, como grande resistência, boa tolerância à variação de fatores ambientais e ao manejo, bem como, hábito alimentar onívoro, quando adulto (MAGO-LECCIA, 2003).

A produção larval de camarões em laboratório (larvicultura) pode ser realizada em sistema aberto ou fechado. Vários autores têm mostrado vantagens no sistema fechado. Pois no sistema aberto a quantidade total de água necessária para a produção de um milhão de pós-

larvas de *Macrobrachium rosenbergii* por mês é de 200 a 250 m³, já no sistema fechado é de apenas 6 a 8 m³, para a mesma produção (RA'ANAN e COHEN, 1983).

Além da economia de água, imprescindível nos dias atuais e em regiões distantes de fontes naturais de água, o sistema fechado de recirculação possibilita manter alto controle das condições do meio de cultivo e elevadas biomassas, em volumes relativamente baixos, graças à utilização de filtros biológicos. Esse sistema consiste na mineralização de compostos orgânicos e denitrificação, por meio da atividade de bactérias, que vivem livres na água ou fixadas ao substrato do filtro, possibilitando a oxidação de amônia (NH₄⁺) em nitrito (NO₂⁻), por meio das bactérias *Nitrossomonas*, daí para nitrato (NO₃⁻), por meio das bactérias *Nitrobacter* (LOBÃO et al., 1998).

Se o processo de oxidação for obstruído, concentrações significativas de amônia e nitrito podem se acumular no ambiente. Caso esses compostos não sejam removidos do sistema, geram condições desfavoráveis para o desenvolvimento dos camarões e em casos extremos podem causar mortalidades em massa. Essas substâncias são fatores determinantes para qualidade da água de cultivo de várias espécies.

Até os dias atuais, não existem estudos reportando os efeitos das concentrações de amônia e nitrito, em larvas do *M. carcinus*, pois a maioria está concentrada em camarões peneídeos e espécies exóticas. Assim, torna-se necessário a realização de estudos a fim de providenciar informações sobre a toxicidade aguda da amônia e do nitrito durante o desenvolvimento larval do *M. carcinus*, bem como estimar os níveis de segurança desses compostos para o processo de larvicultura. Esses resultados podem dar uma valiosa contribuição ao desenvolvimento de técnicas para otimização do processo de larvicultura com fins nos cultivo comerciais e, principalmente, para o repovoamento dos estoques naturais.

2- Revisão de literatura

2.1- Características da espécie

No Nordeste do Brasil o *Macrobrachium carcinus* é conhecido como “pitu” e, em outras regiões, como “lagosta de São Fidelis” ou “lagostinha do Ribeira” podendo atingir grande tamanho, sendo encontrados exemplares entre 23 e 26,5 cm de comprimento e 250 a 340 g de peso (LOBÃO e ROJAS, 1985). Os machos chegam a alcançar, em média, 30 cm e fêmeas 17 cm (HOLTHUIS, 1980). Valenti et al. (1994) registraram uma fêmea com seis anos de idade, medindo 29 cm de comprimento e pesando 190 g. Certamente o *M. carcinus* é um dos maiores camarões de água doce.

Na natureza, o pitu prefere locais com turbulência elevada (correnteza) e substratos rochosos ou arenosos (HOLTHUIS, 1980). Possui também a característica de ser bastante territorialista e agressivo, alimentando-se de tudo que se encontra em seu território (KUTTY et al., 2000). Os juvenis e adultos de *M. carcinus* preferem água doce ou baixas salinidades (0-5 g/L), enquanto que a salinidade entre 16 a 24 g/L seria mais adequada ao cultivo de larvas (VALENTI, 1985; HERMAN et al. 1999).

Para o cultivo, o *M. carcinus* possui variadas vantagens, como grande resistência, boa tolerância à variação de fatores ambientais e ao manejo, bem como, hábito alimentar onívoro, quando adulto (MAGO-LECCIA, 2003), além de possuir grande tamanho e alta fecundidade (quantidade de ovos por fêmea ovígera) (LOBÃO e ROJAS 1985). Kutty et al. (2000) destacaram que a espécie possui maior relação peso-comprimento do que *M. rosenbergii*.

Apesar de todas essas vantagens, a grande problemática na produção larval de *M. carcinus* está no longo tempo de desenvolvimento larval (45 a 70 dias) (VALENTI, 1985; HERMAN et al., 1999; PINHEIRO et al., 2004) e comportamento agressivo, tanto as larvas quanto os adultos, que impõe a utilização de cultivos em baixas densidades, comprometendo a

sobrevivência larval (10-18%) e a produtividade (6-10 pós-larvas/L) (CORREIA e CORDEIRO, 1981; LOBÃO e ROJAS, 1985; GRAZIANI et al. 1993; ABREU et al., 2004; KUTTY e VALENTI, 2010).

2.2- Distribuição geográfica

O gênero *Macrobrachium* (BATE, 1868) é constituído das espécies de camarão de água doce, mais adequadas ao cultivo. São distribuídos nas zonas tropicais e subtropicais do mundo, totalizando aproximadamente 200 espécies. Holthuis (1980) constatou sua ocorrência em todos os continentes, exceto na Europa.

O *M. carcinus* pode ser encontrado desde o sul dos Estados Unidos (Flórida e Texas), América Central até as Antilhas, Colômbia, Venezuela, Suriname e Brasil (do Amapá ao Rio Grande do Sul) (CHOUDHURY, 1971a; HOLTHUIS, 1980; GRAZIANI et al., 1993). Em Pernambuco, a presença da espécie já foi registrada pela literatura nos rios Capibaribe-Mirim, Mamucaba, Jaboatão e Igarassú, além das localidades de Ipojuca e Tamandaré (COELHO et al., 2002).

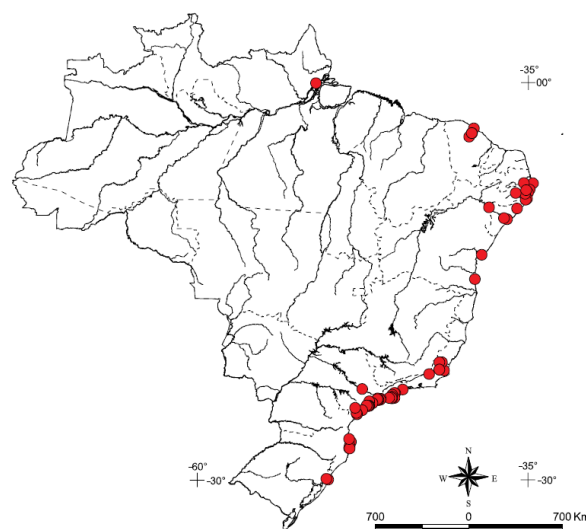


Figura 1 – Distribuição do *Macrobrachium carcinus* no Brasil.

Fonte: MMA, 2008

2.3- Morfologia e sistemática

Os camarões adultos de *M. carcinus* possuem coloração escura, com faixas longitudinais cremes e podem atingir aproximadamente 50 cm de comprimento, desde a extremidade das quelas até o telson, pesando mais de 300 g e a primeira maturação ocorre partir de 10 cm de comprimento (ponta do rostro ao telson) (MMA, 2008). O rostro apresenta uma série de dentes dorsais, que se prolongam sobre a carapaça, num total de 11 a 14 dentes, dos quais quatro a seis sobre a carapaça; a superfície ventral apresenta dois ou três dentes (MMA, 2008).

Os crustáceos ocorrem nos ecossistemas terrestres e aquáticos (dulcícola, marinho e salobro) e são integrantes da Ordem Decapoda (gr. deca, dez + podos, pel) (BOWMAN e ABELE, 1982). De acordo com Pinheiro e Hebling (1998), os decápodos envolvem crustáceos popularmente conhecidos como camarões, lagostas e caranguejos, que são subdivididos nas Subordens Pleocyemata e Dendrobranchiata. Ainda segundo esses autores, os representantes destas subordens diferem, basicamente, quanto ao tipo de reprodução: as fêmeas dos Pleocyemata incubam os ovos nas cerdas pleopodiais do abdome, enquanto que as dos Dendrobranchiata os liberam diretamente na água e estes se desenvolvem no plancton, sem nenhum cuidado adicional. A Subordem Pleocyemata, é dividida em sete infraordens: Stenopodidea, Caridea, Astacidea, Thalassinidea, Palinura, Anomura e Brachyura (BOWMAN e ABELE, 1982). Os representantes da Infra-ordem Caridea encontram-se distribuídos em 22 famílias, dentre elas a Palaemonidae, que abrange, entre outras, os camarões de água doce. O pitu pertence ao gênero *Macrobrachium*, e a espécie é denominada de *Macrobrachium carcinus* (LINNAEUS, 1758).

Segundo o Sistema de Informação Taxonômica Integrada (Integrated Taxonomic Information System – ITIS), a classificação zoológica completa de *M. carcinus*, é apresentada da seguinte forma:

Reino: Animalia;

Filo: Arthropoda;

Subfilo: Crustacea (BRÜNNICH, 1772)

Classe: Malacostraca (LATREILLE, 1802)

Subclasse: Eumalacostraca (GROBEN, 1892)

Superordem: Eucarida (CALMAN, 1904)

Ordem: Decapoda (LATREILLE, 1802)

Subordem: Pleocyemata (BURKENROAD, 1963)

Infra-ordem: Caridea (DANA, 1852)

Superfamília: Palaemonoidea (RAFINESQUE, 1815)

Família: Palaemonidae (RAFINESQUE, 1815)

Subfamília: Palaemoninae (RAFINESQUE, 1815)

Gênero: *Macrobrachium* (BATE, 1868)

Espécie: *Macrobrachium carcinus* (LINNAEUS, 1758)

2.4- Reprodução

Na natureza o *M. carcinus* se reproduz durante a estação chuvosa, portanto, o período varia de acordo com a localidade, por exemplo, em Barbados, a reprodução costuma ocorrer entre maio e outubro (LEWIS et al., 1965), e no Brasil, entre fevereiro e março (VALENTI, 1986). Alcançando o estágio de primeira maturação com 55g e 60 mm de comprimento (VALENTI et al., 1994; ARAÚJO, 2002).

Em confinamento, esta espécie se adapta bem e produz ovos e larvas a partir de fêmeas fecundadas em laboratório (PINHEIRO et al., 2004). Segundo Abreu et al. (2004), a reprodução se inicia pela transferência do esperma do macho para a fêmea, que fica

depositado em uma estrutura especial (espermatóforo). Algum tempo após o acasalamento (25-30 minutos), a fêmea expulsa os óvulos, sendo então fecundados (MORENO et al., 2000). Os ovos fecundados são incubados pela fêmea e se desenvolvem aderidos aos pleópodos, durante um período de 20 dias e o número de larvas produzidas pode variar de 7.000 a 190.000 (LOBÃO, 1997).

Lobão e Rojas (1985) observaram que fêmeas com peso entre 45 e 60 g produzem cerca de 23.000 ovos. Já Coelho et al. (1982) encontraram fêmeas que apresentavam de 10.000 a 80.000 ovos. Segundo Moreno et al. (2000), o *M. carcinus* possui um período de incubação de 24 a 36 dias, e podem produzir de 5.000 a 177.000 larvas por fêmea, dependendo do seu tamanho.

2.5- Desenvolvimento larval

O processo de desova pode levar de 19 a 48 horas. Todos os camarões de água doce têm o desenvolvimento do tipo indireto anamórfico irregular, ou seja, as larvas eclodem como zoea. Nesta fase, a larva de *M. carcinus* passa por 12 estágios zoea até chegar ao estágio de pós-larva, conforme se observa em sequência na Figura 2.

2.6- Larvicultura

De acordo com Lobão (1997), a larvicultura pode ser realizada em sistema aberto ou fechado. Nos sistemas tradicionais abertos, a água é renovada diariamente (50 a 70% do volume do tanque), sendo eliminada e substituída por água nova e limpa, visando reduzir os compostos nitrogenados oriundos dos metabolismos das larvas, náuplios de artêmia e do metabolismo bacteriano na decomposição de resíduos de alimentos, fezes e organismos mortos (CORREIA e CASTRO, 1998).



Figura 2 – Imagens das principais características dos estágios larvais do *Macrobrachium carcinus* baseadas em Coelho et al. (1982).

Já no sistema fechado, que utiliza técnicas mais modernas como filtração (mecânica e biológica) e tratamento químico, há um reaproveitamento total ou parcial da água de cultivo das larvas (DANIELS et al., 1992; CARVALHO FILHO e MATHIAS, 1998; VALENTI et

al., 1998), podendo ser mantidas altas biomassas em um volume relativamente limitado (LOBÃO et al., 1998). No sistema aberto, a água necessária para a produção de um milhão de pós-larvas de *M. rosenbergii* oscila entre 200 e 250 m³, ao passo que, no sistema fechado, não vai além de 6 a 8 m³ (RA'ANAN e COHEN, 1983).

2.7- Alimentação

As larvas de *M. carcinus* são planctônicas e para se alimentarem posicionam-se com a parte dorsal do tórax voltada para baixo e os pereiópodos voltados para cima, movimentando-os de forma coordenada, formando uma corrente de água em direção à boca, quando uma presa é encontrada na água, a larva segura com seus pereiópodos e a leva para boca (SANTOS, 2006).

Estudos feitos com diferentes dietas no cultivo larval do *M. carcinus*, concluíram que a otimização da sobrevivência e desenvolvimento larval pode ser alcançada com uso de náuplios de artêmia, permitindo bom desenvolvimento larval até o VI estágio zoea (CHOUDHURY, 1971b). Segundo Kutty et al. (2000), nos primeiros estágios larvais a alimentação deve ser com náuplios de artêmia (4-5 náuplios por mL). Após 10-12 dias (IV estágio zoea) são atraídas por presas maiores e, por isso, deve ser ofertado alimento inerte (KUTTY e VALENTI, 2010), que pode ser feito com peixe, lula e/ou mexilhão, geralmente preparados em forma de pavê. Santos et al. (2007) concluíram que a melhor sobrevivência (14,83%), em larvas a partir do V estágio, foi obtida com alimentação composta por dieta formulada (peixe fresco e moluscos) e náuplios de artêmia. Ao fornecer o alimento inerte deve-se ter o cuidado de mantê-lo na coluna da água, o que é possível graças à agitação da mesma (COELHO et al., 1982; CARVALHO-FILHO e MATHIAS, 1998).

2.8- Compostos nitrogenados

Os testes de toxicidade aguda avaliam uma resposta severa e rápida dos organismos aquáticos a um estímulo que se manifesta em geral no intervalo de 0 a 96 horas (RAND e PETROCELLI, 1985). Normalmente o efeito observado é a letalidade e objetiva-se com esses testes determinar a Concentração Letal Media (CL_{50}), ou seja, a concentração do agente tóxico que causa mortalidade a 50% dos organismos-teste depois de um determinado tempo de exposição (MAGALHÃES e FERRÃO FILHO, 2008).

De acordo com Rand e Petrocelli (1985), a concentração e o tempo necessário para que um composto produza um efeito adverso, varia conforme o agente químico, a espécie de organismo e severidade do efeito. Ainda segundo esses autores, a tolerância a um determinado poluente é normalmente pequena para organismos de mesma espécie e idade similares e, geralmente, maiores entre espécies diferentes. Já Wajsbrodt et al. (1993), acreditam que a sensibilidade dos organismos a um determinado agente tóxico pode variar de acordo com o seu estágio de desenvolvimento (tamanho, idade), assim como o estado de saúde dos organismos.

Estudos sobre os níveis de metabólitos dissolvidos (amônia e nitrito) no ambiente de cultivo são imprescindíveis e ganham ênfase em sistemas intensivos, fechados de recirculação e durante o transporte dos organismos cultivados, pois a presença desses compostos, mesmo em baixas concentrações são preocupantes (PILLAY, 2005).

Em sistema fechado de larvicultura a amônia requer atenção especial, pois é a principal forma de excreção do nitrogênio em crustáceos, variando de 60 a 70% do nitrogênio total excretado (REGNAULT, 1987). Altas concentrações deste composto podem acarretar retardo no crescimento dos camarões e, em casos extremos, podem causar morte (WAJSBROT et al., 1990; CHEN et al., 1991; ZIN e CHU, 1991).

Na água a amônia apresenta-se sob a forma ionizada (NH_4^+) e não ionizada (NH_3^-), a junção das duas formas constitui a amônia total ($\text{NH}_4^++\text{NH}_3^-$) (OSTRENSKY e WASIELSKY, 1995). Segundo Fromm e Gillette (1968), a forma não ionizada é mais tóxica, devido à capacidade de difundir-se facilmente através da membrana celular. Os efeitos da forma ionizada são considerados menos nocivos (EIFAC, 1983; YU e HIRAYAMA, 1986).

A proporção da amônia tóxica na água de cultivo esta estreitamente relacionada com o pH, salinidade e temperatura, ou seja, à medida que o pH torna-se básico, a salinidade aproxima-se de 0 e a temperatura aumenta, maior será a proporção de amônia inorgânica (ARMSTRONG et al., 1978; BARBIERI 2010; KIR et al., 2004).

Armstrong et al. (1978) constataram que com a elevação do pH (6,83, 7,6 e 8,34), larvas de *M. rosenbergii* são mais suscetíveis a amônia, visto que os valores da Concentração Letal sobre 50 % da população (CL_{50}), em 24 horas de exposição, decresceram respectivamente para 200, 115 e 37 mg de amônia/L. Já com a elevação da salinidade (5, 20 e 35), em juvenis de *Litopenaeus schmitti*, os valores da CL_{50} , em 24 horas, aumentaram para 40,72, 53,52 e 54,32 mg N-amônia/L, respectivamente (BARBIERI, 2010). Por fim, com a elevação da temperatura de 14, 18, 22 para 26 °C, os valores da CL_{50} , em 24 horas, diminuíram 92,2, 57,0, 41,1 e 25,89 mg N-amônia total/L, respectivamente, em juvenis de *Penaeus semisulcatus* (KIR et al., 2004).

O processo de nitrificação possibilita converter a amônia (NH_4^+) em nitrato (NO_3^-), onde o nitrito (NO_2^-) é um produto intermediário. Concentrações significativas de nitrito podem se acumular no ambiente caso a conversão para nitrato seja obstruída (THURSTON et al., 1978), devido à (a) filtros floristicamente imaturos, falhando na conversão do nitrito em nitrato, (b) fluxo rápido de água através do filtro, taxa de filtração superior à necessária para completa nitrificação bacteriana antes do retorno ao tanque de cultivo, (c) condições de filtro

pobres, tais como baixo oxigênio dissolvido, levando a condições anaeróbias e conversão de volta (denitrificação) de nitrato para nitrito (EPIFANIO e SRMA, 1975). O aumento da concentração de nitrito no ambiente retarda o desenvolvimento larval, reduz o ganho de peso e a sobrevivência, tanto no início como no final do ciclo larval do *Macrobrachium rosenbergii* (MALLASEN e VALENTI, 2006).

Observando o estudo de toxicidade aguda com larvas de *Macrobrachium rosenbergii*, pode-se concluir que o nitrito é mais tóxico que a amônia, visto que os valores CL₅₀, em 96h, foram 12 mg N-amônia/L (15 mg amônia/L) e 8,6 mg N-nitrito/L (ARMSTRONG et al., 1976, 1978). Já em juvenis de *Litopenaeus vannamei* os valores de CL₅₀, em 96 h, foram 9,33 mg N-amônia/L e 9 mg N-nitrito/L, ou seja, níveis bem próximos (LI et al., 2007; GROSS et al., 2004). E em náuplios de artêmia a tolerância ao nitrito foi bem maior do que à amônia, visto que, em 48 h as CL₅₀ foram 334,7 mg NAT/L e 1.141,0 mg N-NO₂/L (CHEN et al., 1989).

3- Referências bibliográficas

ABREU, V.L.B.; FAÇANHA, S.C.; PINHEIRO, S.M.X.; VEIRA, M.J.A.F. Observações sobre o acasalamento do camarão pitu, *Macrobrachium carcinus* (LINNAEUS, 1758), em cativeiro. In: IV Simpósio Brasileiro do Camarão Cultivado, 2004, Natal, RN. **Anais**. Natal/RN. ABCC, 2004. p.27.

ARAÚJO, O.M. Aspectos da biologia e da exploração pesqueira dos camarões do gênero *Macrobrachium* Bate, 1888 (Decapoda: Palaemonidae) na Bacia do Rio Cachoeira, Bahia. 2002. 116 p. **Dissertação (Mestrado)**-Universidade Estadual de Santa Cruz.

ARMSTRONG, D.A.; CHIPPENDALE, D.; KNIGHT, A.W.; COLT, J.E. Interaction of ionized and un-ionized ammonia on short-term survival and growth of prawn larvae, *Macrobrachium rosenbergii*. **Biol. Bull**, v.154, p.15-31, 1978.

ARMSTRONG, D.A.; STEPHENSON, M.J.; KNIGHT, A.W. Acute toxicity of nitrite to larvae of the giant Malaysian prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture**, v.9, p.39-46, 1976.

BARBIERI, E. Acute toxicity of ammonia in white shrimp (*Litopenaeus schmitti*) (BURKENROAD, 1936, Crustacea) at different salinity levels. **Aquaculture**, v.306, p.329–333, 2010.

BOWLES, D.E.; AZIZ, K.; KNIGHT, C.L. *Macrobrachium* (Decapoda: Caridea: Palaemonidae) in the contiguous United States: a review of species and assessment of threats to their survival. **Journal of Crustacean Biology**, v.20, p.158-171, 2000.

BOWMAN, T.E.; ABELE, L.G. Classification of the Recent Crustacea. Pages 1-27. In: ABELE L.G. (Editor). *The Biology of Crustacea: Systematics, the fossil record, and Biogeography*. **Academic Press**, Inc., New York, v.1, 319p, 1982.

CARVALHO-FILHO, J.; MATHIAS, M.A.C. Larvicultura em sistema fechado estático. In: VALENTI, W.C. *Carcinicultura de água doce*. Brasília, 1998. p.95-114.

CHEN, J.C.; LIU, P.C.; NAN, F.H. Acute toxicity ammonia to larvae *Metapenaeus*. **Asian Fish Science**, v.4, p.41-51, 1991.

CHEN, J.C.; CHEN, K.J.; LIAO, J.M. Joint action of ammonia and nitrite on *Artemia* nauplii. **Aquaculture**, v.77, p.329–336, 1989

CHOUDHURY, P.C. Responses of larval *Macrobrachium carcinus* (LINNAEUS, 1758) to variations in salinity and diet (Decapoda, Palaemonidae). **Crustaceana**, v.20, n.2, p.113-120, 1971a.

CHOUDHURY, P.C. Complete larval development of the Palaemonidae shrimp *M. carcinus* (LINNAEUS, 1758) reared in the laboratory (Decapoda, Palaemonidae). **Crustaceana**, v.20, n.1, p.56-69, 1971b.

COELHO, P.A.; PORTO, M.R.; SOARES, C.M.A. *Biologia e cultivo de camarões de água doce*. **Série Aquicultura**, Recife, PE: UFPE, v.1, 58 p, 1982.

COELHO, P. A.; COELHO-SANTOS, M. A.; TORRES, M. F. A.; MONTEIRO, B. R.; ALMEIDA, V. A. K. Reino Animália: Filo (ou Subfilo) Crustacea no estado de Pernambuco. In: TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (Orgs). Diagnóstico da Biodiversidade de Pernambuco. Recife: Editora Massangana, 2002. p.429-482.

CORREIA, E.S.; CASTRO, P.F. Larvicultura em sistema aberto. In: VALENTI, W. C. (Eds.). Carcinicultura de água doce: tecnologia para produção de camarões. Brasília: IBAMA, FAPESP, 1998. p.77-94.

CORREIA, E.S.; CORDEIRO, E.A. Estudo comparativo do crescimento de camarões de água doce no estado de Pernambuco. In: II Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca, 1981. Recife. **Anais**. Recife/PE. AEP-PE, 1981. p.155-160.

DANIELS, W.H.; D'ABRAMO, L.R.; PARSEVAL, L. Design and management of a closed, recirculating "clearwater" hatchery system for freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1979). **Journal of Shellfish Research**, v.11, n.1, p.65-73, 1992.

EIFAC (European Inland Fisheries Advisory Commission). Water quality criteria for European freshwater fish. **Water Res.**, v.7, p.1011-1022, 1983.

EPIFANIO, C.E.; SRNA, R.F. Toxicity of ammonia, nitrite ion, nitrate ion, and orthophosphate to *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica*. **Mar. Biol.**, v.33, p.241-246, 1975.

FROMM, P.O.; GILLETTE, J.R. Effect of ambient ammonia on blood ammonia and nitrogen excretion of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Comp. Biochem. Physiol.**, v.26, p.887-896, 1968.

GRAZIANI, C.A.; CHUNG, K.S.; DONATO, M. Comportamiento reproductivo y fertilidade de *Macrobrachium carcinus* (Decapoda: Palaemonidae) em Venezuela. **Revista de Biologia Tropical**, v.41, n.3A, p.657-665, 1993.

GROSS, A.; ABUTBUL, S.; ZILBERG, D. Acute and Chronic Effects of Nitrite on White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, Cultured in Low-Salinity Brackish Water. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.35, n.3, 2004.

HERMAN, F.; FIEVET E; BOUCHER, P. Potentialités et intérêts de l'élevage larvaire de la crevette d'eau douce indigène *Macrobrachium carcinus* (L.) (Palaemonidae) aux Antilles françaises. **Bull. Fr. Pêche Piscic.**, v.352, p.81-90. 1999.

HOLTHUIS, L.B. FAO species catalogue. Shrimps and Prawns of the World. An annotated catalogue of species of interest to fisheries. **FAO Fish Synopses**, v.125, n.1, 271 p, 1980.

IBAMA, 2004. Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Instrução Normativa nº 5, de 21 de maio de 2004.

ITIS. **Integrated Taxonomic Information System**. Disponível em: <<http://www.itis.gov>>. Acesso em: 10 maio 2013.

KIR, M.; KUMLU, M.; EROLDOGAN, O.T. Effects of temperature on acute toxicity of ammonia to *Penaeus semisulcatus* juveniles. **Aquaculture**, v.241, p.479–489, 2004.

KUTTY, M.N.; VALENTI, W.C. Culture of other freshwater prawn species. In: NEW, M.B.; VALENTI, W.C.; TIDWELL, J.H.; D'ABRAMO, L.R.; KUTTY, M.N. (Eds.) *Freshwater Prawns: Biology and Farming*. Blackwell Science, Great Britain, 2010. p.502-522.

KUTTY, M.N.; HERMAN, F.; LE MENN, H. Culture of other prawn species. In: NEW, M.B.; VALENTI, W.C. (Ed.). *Freshwater prawn culture: the farming of *Macrobrachium rosenbergii**. Oxford: Blackwell Science, cap.21, 2000. p.393-410.

LEWIS, J.B.; WARD, I. Developmental stages of the Palaemonidae shrimp *Macrobrachium carcinus* (LINNAEUS, 1758). **Crustaceana**, v.9, n.2, p.137-148, 1965.

LI, E.; CHEN, L.; ZENG, C.; CHEN, X.; YU, N.; LAI, Q.; QIN, J.G. Growth, body composition, respiration and ambient ammonia nitrogen tolerance of the juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at different salinities. **Aquaculture**, v.265, p.385–390, 2007.

LING, S.W.; COSTELLO, T.J. The culture of freshwater prawns: a review. In: *Advances in Aquaculture. Papers presented in the FAO Technical Conference on Aquaculture, 26 May – 02 June 1976, Kyoto*, (Ed. by PILLAY, T.V.R. e DILL, W.A.), Fishing News Books, Blackwell Science, Oxford, 1979. p.299-304.

LOBÃO, V.L.; ROJAS, N.E.T. **Camarões de água doce da coleta ao cultivo e à comercialização**. Coleção Brasil Agrícola. São Paulo: Ícone Editora. 1985.

LOBÃO, V.L. **Camarão-da-Malásia: larvicultura**. Brasília: Embrapa-SPI, 1997. 119p.

LOBÃO, V.L.; LUZIA, L.A.; SAMPAIO, G.R.; HORTENCIO, E.; SOUZA, A.M. de Estudo comparativo entre quatro métodos de sistemas fechados de circulação em larvicultura de *Macrobrachium rosenbergii*. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.25 (único), p.101-109, 1998.

MAGALHÃES, D.P.; FERRÃO FILHO, A.S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecol. Bras.**, v.12, n.3, p.355-381. 2008

MAGO-LECCIA, F. **El cultivo del camarón de río *Macrobrachium carcinus*, un potencial desestimado en Venezuela**. 2003. Disponível em: <<http://www.ceniap.gov.ve/publica/divulga/fd50/camaron.htm>>. Acesso em: 15 maio 2012.

MALLASEN, M.; VALENTI, W.C. Effect of nitrite on larval development of giant river prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture**, v.261, p.1292-1298, 2006.

MMA. Ministerio do Meio Ambiente. **Invertebrados aquáticos: a situação de ameaça dos invertebrados aquáticos no Brasil**. In: MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. (Ed.) Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Brasília (DF): MMA; Belo Horizonte (MG): Fundação Biodiversitas, 2008. 1420p.

MONTENEGRO, S.C.S.; NORDI, N.; MARQUES, J.G.W. Contexto cultural, ecológico e econômico da produção e ocupação dos espaços de pesca pelos pescadores de pitu (*Macrobrachium carcinus*) em um trecho do baixo São Francisco, Alagoas-Brasil. **Interciencia**, Caracas, v.11, n.26, p.535-540, 2001.

MORENO, C.A.; GRAZIANI, C.A.; ORTA, T.J. Reproducción natural y artificial del camarón de río *Macrobrachium carcinus* (L.). **Interciencia**, v.25, n.5, p.249-253, 2000.

OSTRENSKY, A.; WASIELSKY, W. Acute toxicity of ammonia to various life stages of the São Paulo shrimp, *Penaeus paulensis* (PÉREZ-FARFANTE, 1967). **Aquaculture**, v.132, p.339-347, 1995.

PILLAY, T.V.R. Aquaculture Principles and Practices. 2nd Ed. Fishing News Books. **Blackwell Science**, Oxford, UK, 2005. 624 pp.

PINHEIRO, S.M.X.; FAÇANHA, S.C.; ABREU, V.L.B.; MAVIGNIER, G.V.L.; VIEIRA, M.J.A.F. Acasalamento em confinamento e larvicultura do pitu *Macrobrachium carcinus* (LINNAEUS, 1758). In: AquaCiência 2004. Tópicos especiais em biologia e aqüicultura. Vitória, ES. **Anais**. Jaboticabal/SP, 2004. p. 219-226.

PINHEIRO, M.A.A.; HEBLING, N.J. Biologia de *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). In: VALENTI, W.C. (ed.), Carcinicultura de água doce. Tecnologia para produção de camarões. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Brasília, 1998. p.21-46.

RA'ANAN, Z.; COHEN, D. Production of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* in Israel. II Selective Stocking of size subpopulations. **Aquaculture**, Amsterdam, v.31, p.369-379, 1983.

RAND, G.M.; PETROCELLI P.R. **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. Ed. Taylor & Francis, USA, 1985. 666p.

REGNAULT, M. Nitrogen excretion in marine and fresh-water Crustacea. **Biol. Rev.**, v.62, p.1-24, 1987.

RODRIGUES, R.V.; SCHWARZ, M.H.; DELBOS, B.C.; SAMPAIO, L.A. Acute toxicity and sublethal effects of ammonia and nitrite for juvenile cobia *Rachycentron canadum*. **Aquaculture**, v.271, p.553-557, 2007.

SANTOS, E.P.; LEAL, A.L.G.; SILVA, P.M.M.; CORREIA, E.S. Influência de diferentes dietas na sobrevivência larval do camarão de água doce *Macrobrachium carcinus* (LINNAEUS, 1758). **Acta Science Biology Science**, v.29, n.2, p.121-124, 2007.

THURSTON, R.V.; RUSSO, R.; SMITH, C.E. Acute toxicity of ammonia and nitrite to cutthroat Trout fry. **Trans. Am. Fish Soc.**, v.107, n.22, p.361-368, 1978.

VALENTI, W.C.; MALLASEN, M.; SILVA, C.A. Larvicultura em sistema fechado dinâmico. In: VALENTI, W.C. (Eds.). Carcinicultura de água doce: tecnologia para produção de camarões. Brasília: IBAMA; FAPESP, 1998. p.115-144.

VALENTI, W.C. **Cultivo de Camarões de Água Doce**. São Paulo: Nobel, 1985. 82p.

VALENTI, W.C. Freshwater prawn culture in Brazil. **World Aquaculture**, v.24, n.1, p.30-34, 1993.

VALENTI, W.C.; MALLASEN, M.; SILVA, C.A. Larvicultura em sistema fechado dinâmico. In: VALENTI, W.C.; MELLO, J.T.C.; LOBÃO, V.L. Maturation and growth curves of *Macrobrachium carcinus* (LINAEUS, 1758) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) from Ribeira do Iguape, Southern Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, São Paulo, v.11, n.4, 1994. p.649-658.

VALENTI, W.C. **Cultivo de camarões de água doce**, São Paulo: Livraria Nobel. p. 01-80. 1986.

WAJSBROT, N.; GASITH, A.; KROM, M.D.; SAMOCHA, T.M. Effect of dissolved oxygen and the molt stage on the acute toxicity of ammonia to juvenile green tiger prawn *Penaeus semisulcutus*. **Environ. Toxicol. Chem.**, v.9, p.497-504, 1990.

WAJSBROT, N.; GASITH, A.; DIAMANT, A.; POPPER, D.M. Chronic toxicity of ammonia to juvenile gilthead seabream *Sparus aurata* and related histopathological effects. **Journal of Fish Biolog**, v.42, p.321-328, 1993.

YU, J.P.; HIRAYAMA, K. The effect of un-ionized ammonia on the growth of the rotifer in mass culture. *Bull. Jpn. Sot. Sci. Fish*, v.52, p.1509-1513, 1986.

ZIN, K.Y.; CHU, C.J. Acute toxicity of ammonia to *Penaeus japonicus* Bate juveniles. **Aquacult. Fish. Manag.**, v.22, p.259-263, 1991.

4- Artigo científico

TOXICIDADE AGUDA DA AMÔNIA E DO NITRITO EM LARVAS DE PITU

Macrobrachium carcinus

Artigo científico a ser encaminhado a Revista **Aquaculture
Research**, ISSN: 1365-2109.

Todas as normas de redação e citação, deste capítulo, atendem as estabelecidas pela referida revista (em anexo).

25 (0,50, 0,71 e 0,92 mg N-NH₃ L⁻¹) e 3,28, 9,73 e 34,00 mg N-NO₂ L⁻¹, respectivamente. As
26 CL₅₀ estimadas para N-NO₂ foram menores do que as de NAT na maior parte dos estágios
27 avaliados. Isto sugere que as larvas de *M. carcinus* são mais tolerantes à amônia, exceto no Z₈,
28 onde as larvas apresentaram uma maior resistência ao nitrito. Com base nas concentrações
29 letais em 96 h, pode-se concluir que a tolerância das larvas de *M. carcinus* à amônia e nitrito
30 aumenta com o desenvolvimento larval e os níveis de segurança foram estimados em 0,834
31 mg L⁻¹ de NAT (0,05 mg N-NH₃ L⁻¹) e 0,328 mg N-NO₂ L⁻¹, para todo o processo de
32 larvicultura do *M. carcinus*.

33

34 **Palavras-chave:** Camarão pitu; zoea; nível de segurança; compostos nitrogenados

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

70 INTRODUÇÃO

71 O camarão de água doce pitu, *Macrobrachium carcinus* (Linnaeus 1758), é uma espécie
72 endêmica do Brasil e pode ser encontrado do Norte (Amapá) até o extremo Sul (Rio Grande
73 do Sul) (MMA 2008). Nessas regiões, o pitu possui grande importância econômica para pesca
74 artesanal, pois é bastante apreciado pela culinária local e podem atingir grandes tamanhos e
75 pesos. Porém, nos últimos anos sua oferta foi bastante reduzida devido à sobrepesca, poluição
76 e destruição dos ambientes naturais (Valenti 1993; Herman *et al.* 1999; Bowles *et al.* 2000).
77 Atualmente, o *M. carcinus* encontra-se na lista oficial de espécies ameaçadas de extinção e
78 tem sua pesca proibida conforme Instrução Normativa do Instituto Brasileiro do Meio
79 Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA 2004). Neste contexto, a aquicultura
80 surge como uma alternativa para suprir a demanda desse crustáceo e possível meio de
81 preservação da espécie por meio de iniciativas de repovoamento.

82 Um das primeiras etapas para o sucesso na produção de qualquer espécie é o domínio
83 da produção de larvas em laboratório (larvicultura), que pode ocorrer em sistemas abertos ou
84 fechados. Nos sistemas fechados, a amônia requer atenção especial, pois é o principal produto
85 de excreção dos crustáceos (Cavalli *et al.* 2000; Racotta & Herrera 2000), além de se
86 acumular ao longo do tempo devido, principalmente, à decomposição dos compostos
87 orgânicos e a excreção dos animais cultivados (Romano & Zeng 2007).

88 A amônia (NH_4^+) pode ser convertida em nitrito (NO_2^-) por meio das bactérias
89 *Nitrosomonas*, e para nitrato (NO_3^-), por meio das bactérias *Nitrobacter* (Timmons & Ebelins
90 2007). O nitrito também pode se acumular no ambiente de cultivo, caso essa conversão seja
91 obstruída devido às falhas na conversão para nitrato, fluxo rápido de água através dos filtros e
92 condições pobres dos filtros, como baixos níveis de oxigênio dissolvido, levando à condições
93 anaeróbicas e à denitrificação (Epifanio & Srna 1975).

94 Os compostos nitrogenados, em níveis elevados, são altamente tóxicos para os
95 organismos aquáticos. Nos crustáceos a amônia pode afetar o equilíbrio ácido-base, a
96 osmolaridade da hemolinfa, o metabolismo do nitrogênio, a respiração, as taxas de
97 crescimento, bem como aumentar a frequência de mudas (Chen & Kuo 1992; Chen & Lai
98 1992; Chen & Cheng, 1993) e, em casos extremos, pode até causar mortalidade em massa
99 (Wajsbrodt *et al.* 1990; Zin & Chu 1991). A incorporação do nitrito na hemolinfa dos
100 crustáceos pode reduzir os níveis de hemocianina e oxidar o pigmento respiratório (Needham
101 1961). Em altas concentrações o nitrito retarda o desenvolvimento larval, reduz o ganho de
102 peso e a sobrevivência, tanto no início como no final do ciclo larval do *Macrobrachium*
103 *rosenbergii* (Mallasen & Valenti, 2006).

104 De acordo com Rand e Petrocelli (1985) os testes de toxicidade aguda avaliam uma
105 resposta severa e rápida dos organismos aquáticos a um estímulo que se manifesta em geral
106 no intervalo de 0 a 96 horas. Normalmente o efeito observado é a letalidade e objetiva-se com
107 esses testes determinar a Concentração Letal média (CL₅₀), ou seja, a concentração do agente
108 tóxico que causa mortalidade em 50% dos organismos-teste depois de um determinado tempo
109 de exposição (Magalhães & Ferrão Filho, 2008).

110 As toxicidades de amônia e nitrito em larvas de *M. carcinus* ainda são desconhecidas,
111 pois a maioria dos estudos está concentrada em camarões peneídeos e na espécie exótica *M.*
112 *rosenbergii*. Desta forma, o presente estudo foi realizado com o objetivo de determinar CL₅₀
113 de amônia e do nitrito em três diferentes estágios larvas de *M. carcinus*, a fim de verificar
114 alguma tendência de tolerância e estimar níveis seguros desses compostos durante o processo
115 de larvicultura.

116

117

118 MATERIAL E MÉTODOS

119 Fêmeas ovígeras de pitu *M. carcinus*, provenientes do Rio Una, localizado em
120 Barreiros-PE (08°47'14,8"S e 035°12'35,4"W) foram capturadas e transportadas (Licença N°.
121 35782-2 MMA/ICMBio/SISBIO) até Larvicultura de Camarão de Água Doce da Estação de
122 Aquicultura Continental Prof. Johei Koike-UFRPE, em Dois Irmãos, Recife-PE. Após a
123 eclosão, ocorrida em água doce, as larvas foram transferidas para tanques de cultivo, onde
124 foram gradativamente aclimatadas à salinidade de 20 g L⁻¹, com elevação diária de 5 g L⁻¹.

125 O estudo englobou três estágios do desenvolvimento larval do *M. carcinus*, com larvas
126 predominantemente nos estágios zoea II, V e VIII, denominados de Z₂, Z₅, e Z₈,
127 respectivamente. Para cada estágio, foi realizado um teste de toxicidade aguda de N-amônia
128 total (NAT) e N-nitrito (N-NO₂) em salinidade de 20 g L⁻¹.

129 O desenvolvimento das larvas foi estimado através da identificação dos estágios larvais,
130 com o auxílio de microscópio estereoscópio, conforme Coelho *et al.* (1982). Com base nestes
131 resultados foi calculado o índice de desenvolvimento larval (IDL), de acordo com a equação
132 adaptada de Manzi *et al.* (1977).

133 Em cada estágio foram adotados delineamentos experimentais inteiramente
134 casualizados, com cinco tratamentos referentes às concentrações de NAT (5, 10, 20, 40 e 80
135 mg L⁻¹), a partir da adição de cloreto de amônia (NH₄Cl), seis tratamentos de N-NO₂ (5, 10,
136 20, 40, 80 e 160 mg L⁻¹), preparados com nitrito de sódio (NaNO₂), e um tratamento controle
137 (sem adição de NH₄Cl ou NaNO₂), todos com três repetições. Foi necessário acrescentar um
138 tratamento extra com concentração de 320 mg N-NO₂ L⁻¹ no estágio Z₂, para poder estimar a
139 CL₅₀ nas primeiras 24 h de exposição.

140 As concentrações utilizadas foram definidas em testes preliminares, utilizando-se uma
141 escala geométrica com fator 2, de modo a obter a CL₅₀ em 24, 48, 72 e 96 horas. A

142 metodologia utilizada nos experimentos de toxicidade aguda foi baseada em Greenberg *et al.*
143 (1992) e no manual da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA 1985).

144 Para estocagem do experimento nos estágios determinados, as larvas foram coletadas
145 aleatoriamente nos tanques de cultivo, contadas e transferidas para as unidades experimentais,
146 as quais consistiram de recipientes plásticos com 1,5 L de volume útil, preenchidos com água
147 salobra (20 g L^{-1}) e aeração constante oriunda de compressores radiais, com auxílio de
148 mangueiras de silicone e pedras porosas. As densidades de estocagens foram reduzidas de
149 acordo com o desenvolvimento larval ($Z_2 = 66$, $Z_5 = 53$, $Z_8 = 33 \text{ larvas L}^{-1}$), com o intuito de
150 minimizar as diferenças de biomassa entre os estágios.

151 A salinidade da água foi ajustada em 20 g L^{-1} , por diluição de água do mar com água
152 doce, previamente filtrada, esterilizada com hipoclorito de sódio (10 ppm de cloro ativo), e
153 declorada com vitamina C (1 mg L^{-1}) sob aeração por 24 horas. A cada 24 horas era feita a
154 contagem dos organismos vivos, retirada dos mortos e a renovação de 100% das soluções
155 para preservação das concentrações-teste. A ausência de movimentos e resposta a estímulos
156 mecânicos, com auxílio de uma micropipeta, foram os critérios adotados para determinar a
157 morte das larvas, sendo registrada em 24, 48, 72 e 96 h, após exposição às concentrações de
158 amônia e nitrito.

159 A alimentação das larvas constou de náuplios de artêmia recém-eclodidos, na proporção
160 de $1\text{-}2 \text{ mL}^{-1}$ (30-40 náuplios por larva), ofertados uma única vez ao dia, sempre após a
161 renovação das concentrações-teste. Foi mantido fotoperíodo natural (13 h claro: 11 h escuro)
162 e a temperatura, oxigênio dissolvido e pH foram monitorados diariamente, duas vezes ao dia
163 (manhã e tarde), com auxílio de equipamento multiparâmetro (YSI Incorporation, modelo
164 YSI 556 MPS multi-probe). Os níveis de nitrogênio na forma de amônia não ionizada (N-
165 NH_3) foram determinados utilizando a equação de Ostrensky *et al.* (1992) adaptada de

166 Whitfield (1974) e Bower e Bidwell (1978), com base nas concentrações de NAT e nos
167 valores de temperatura, salinidade e pH (Tabela 1).

168 As CL_{50} de NAT e $N-NO_2$ foram calculados com o software Trimmed Spearman Karber
169 Method, para cada período de 24 h até 96 h, com intervalos de confiança (95%) (Hamilton *et*
170 *al.* 1977) e foram confrontadas por meio das comparações múltiplas de intervalo de confiança
171 (Greenberg *et al.*, 1992). Os níveis de seguranças (concentração de poluentes que não tenha
172 um efeito adverso sobre os organismos) foram estimados com base em Sprague (1971). As
173 taxas de mortalidade foram submetidas aos testes de normalidade e homogeneidade para
174 realização da Análise de Variância (ANOVA), complementada pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$)
175 com o auxílio do software Statistica 7.0.

176

177 **RESULTADOS**

178 *Toxicidade aguda da amônia*

179 Com a elevação da concentração de 0 para 80 mg NAT L⁻¹, a taxa de mortalidade
180 aumentou significativamente ($P<0,05$) nos três estágios larvais (Figura 1 A, B e C). No
181 estágio Z₂ foi constatada 100% de mortalidade no tratamento de 80 mg NAT L⁻¹, em 48 h e
182 alta taxa de mortalidade (35%) no tratamento controle em 96 h (Figura 1 A). Já no Z₅, a
183 mortalidade no controle em 96 h não ultrapassou 20% e a mortalidade total foi observada nos
184 tratamentos de 40 e 80 mg NAT L⁻¹, em 48 e 24 h, respectivamente (Figura 1 B). No estágio
185 Z₈, também ocorreu baixa mortalidade no controle em 96 h (17,33%) e 100% de mortalidade
186 nas concentrações de 40 e 80 mg NAT L⁻¹, porém em períodos diferente, em 96 e 48 h,
187 respectivamente (Figura 1 C).

188 As CL_{50} para larvas de *M. carcinus*, expostas a diferentes concentrações de NAT,
189 decresceram com o tempo nos três estágios avaliados. Observou-se que as larvas de *M.*

190 *carcinus* tendem a ser mais tolerante à amônia no final do desenvolvimento larval, pois na
191 maior parte do período avaliado, os valores de CL_{50} das larvas no Z_8 foram significativamente
192 maiores ($P < 0,05$) que os demais estágios larvais (Tabela 2).

193 O nível máximo suportado por uma espécie ou população a um composto tóxico pode
194 ser estimado a partir da multiplicação de um fator de aplicação (0,1) pela CL_{50} no estágio
195 larval mais sensível ao composto tóxico (Sprague 1971). No presente trabalho o nível de
196 segurança foi estimado com base na CL_{50} calculada no estágio Z_2 em 96 h, ou seja, 8,34 mg
197 $NAT L^{-1}$ (0,50 mg $N-NH_3 L^{-1}$). Então, multiplicando o fator de aplicação (0,1) pela CL_{50} no
198 estágio larval mais sensível (Z_2) ao composto tóxico obtêm-se o nível de segurança de 0,834
199 mg $NAT L^{-1}$ (0,05 mg $N-NH_3 L^{-1}$).

200

201 *Toxicidade aguda do nitrito*

202 Com a elevação da concentração de $N-NO_2$, a taxa de mortalidade aumentou
203 significativamente, nos três estágios larvais (Figura 2 A, B e C). No estágio Z_2 , nas primeiras
204 24 h, a concentração de 320 mg $N-NO_2 L^{-1}$ acarretou pouco mais que 55% de mortalidade,
205 entretanto em 48 horas, houve 100% de mortalidade nas concentrações de 160 e 320 mg $N-$
206 $NO_2 L^{-1}$ (Figura 2 A). Já Z_5 foi constatado 100% de mortalidade nos tratamentos de 40 e 80
207 mg $N-NO_2 L^{-1}$, em 96 h, e na concentração de 160 mg $N-NO_2 L^{-1}$, em 48 h de exposição
208 (Figura 2 B). No estágio Z_8 , só após 72 h de exposição, houve mortalidade total nas
209 concentrações de 80 e 160 mg $N-NO_2 L^{-1}$ (Figura 2 C).

210 Os valores de CL_{50} em larvas de *M. carcinus* expostos a diferentes concentrações de $N-$
211 NO_2 decresceram com o tempo, nos três estágios avaliados. Observou-se também, que as
212 larvas de *M. carcinus* tendem a ser mais tolerante ao nitrito no final do desenvolvimento

213 larval, visto que na maior parte do período avaliado, os valores de CL_{50} das larvas no Z_8
214 foram significativamente maiores do que os demais estágios larvais ($P < 0,05$) (Tabela 3).

215 O nível de segurança foi estimado com base na CL_{50} calculada no estágio Z_2 em 96 h,
216 ou seja, 3,28 mg N- NO_2 L⁻¹ e o cálculo do nível de segurança para larvas de *M. carcinus*,
217 conforme Sprague (1971), foi igual a 0,328 mg N- NO_2 L⁻¹.

218

219 **DISCUSSÃO**

220 O manejo alimentar adotado foi considerado satisfatório, pois em todas as unidades
221 experimentais, dos estágios avaliados, foi constatada a presença de náuplios de artêmia antes
222 da renovação da água dos tratamentos. Segundo Chen et al. (1989), em 24 h as CL_{50} em
223 náuplios de artêmia são 839,5 mg NAT L⁻¹ e 1.609,7 mg N- NO_2 L⁻¹, por isso, as elevadas
224 concentrações de 80 mg NAT L⁻¹ e 320 mg N- NO_2 L⁻¹ deste estudo não provocaram efeito
225 algum sobre os náuplios ofertado como alimento.

226 Os compostos nitrogenados são fatores primordiais para qualidade da água de cultivo de
227 várias espécies. Embora a tolerância à amônia e nitrito sejam diferentes, entre os mais
228 variados animais aquáticos, eles são tóxicos para artêmia (Chen *et al.* 1989), camarão marinho
229 (Lin *et al.* 1993; Ostrensky *et al.* 1992; Ostrensky & Wasielesky 1995), camarão de água doce
230 (Armstrong *et al.* 1976 e 1978; Figueroa-Lucero *et al.* 2012), caranguejo (Zhao *et al.* 1997;
231 1998; Seneriches-Abiera *et al.* 2007; Romano & Zeng 2007) e peixes (Tabata 1962; Hasan &
232 Macintosh 1986; Rodrigues *et al.* 2007).

233 A tendência das larvas de *M. carcinus* serem mais tolerantes à amônia e ao nitrito no
234 final do desenvolvimento larval pode está relacionada com avançado desenvolvimento
235 morfológico inerente ao estágio Z_8 , uma vez que as demais modificações são as formações de

236 dentes dorsais e ventrais do rostro, de acordo com as características do desenvolvimento
237 larval relatadas por Coelho *et al.* (1982).

238 A tendência de maior tolerância à amônia no final do desenvolvimento larval, também
239 foi observada em larvas de *Eriocheir sinensis*, em vários estágios de zoea (Zhao *et al.* 1997;
240 1998) e em varias fases larvais de *Penaeus japonicus* (Lin *et al.* 1993). Porém Mawatari e
241 Hirayama (1975) observaram tendência oposta, ou seja, uma diminuição na tolerância à
242 amônia ao longo do desenvolvimento larval de *P. japonicus* e *Penaeus orientalis*. O mesmo
243 foi observado em larvas de *Penaeus paulensis* (Ostrensky *et al.* 1992; Ostrensky &
244 Wasielesky 1995). Segundo esses autores, por se alimentarem de vitelo, os náuplios teriam
245 uma maior resistência às diversidades do ambiente externo.

246 Segundo Wajsbrodt *et al.* (1993), a sensibilidade dos organismos a um determinado
247 agente tóxico pode variar de acordo com o seu estágio de desenvolvimento (tamanho e idade).
248 Entretanto, Chen *et al.* (1991) não verificaram tendência alguma, em larvas de *Metapenaeus*
249 *ensis*, pois dentre as fases avaliadas (náuplios III, zoea II, mysis II e pós-larva I e X), zoea foi
250 a menos tolerante e mysis a mais resistente à amônia.

251 As CL₅₀ em 96 h são utilizadas para estimar a toxicidade de agentes tóxicos aos
252 organismos-teste. Comparando a CL₅₀ de amônia de diferentes crustáceos (Tabela 4), pode-se
253 dizer que o valor estimado de 8,34 mg NAT L⁻¹ para larvas de *M. carcinus* no Z₂, foi maior do
254 que 6,1 mg L⁻¹ em larvas Z₁ de *P. japonicus* (Lin *et al.* 1993) e menor que 9,4 e 12,0 mg L⁻¹
255 em larvas de *P. paulensis* (Ostrensky & Wasielesky 1995) e em larvas de *Macrobrachium*
256 *rosenbergii*, (Armstrong *et al.* 1978), respectivamente. Deve-se ressaltar que a toxidez da
257 amônia tende a ser maior aos organismos aquáticos à medida que o pH aumenta, a salinidade
258 diminui e a temperatura aumenta (Armstrong *et al.* 1978; Barbieri 2010; Kir *et al.* 2004), pois
259 nessas condições há uma maior proporção de amônia não ionizada (NH₃) na água.

260 A tolerância às elevadas concentrações de N-NO₂ das larvas no Z₂, nas primeiras 24 h,
261 gerou uma CL₅₀ de 294,16 mg L⁻¹, enquanto que nos estágios Z₅ e Z₈ os valores de CL₅₀ foram
262 116,97 e 135,48 mg L⁻¹, respectivamente (Tabela 3). Esta maior resistência ao nitrito no
263 estágio Z₂ provavelmente foi devido ao fato de larvas de *M. carcinus* se alimentarem de vitelo
264 no estágio de zoea I, resultando numa menor dependência do meio externo. Como o
265 experimento foi realizado com larvas no início do estágio II é possível que elas tenham
266 mantido esse comportamento por ainda possuir reservas nutritivas do estágio anterior.

267 Já em 48 h, no Z₂, ocorreu 100% de mortalidade nas concentrações de 160 e 320 mg N-
268 NO₂ L⁻¹ e altas taxas de mortalidade em 40 e 80 mg N-NO₂ L⁻¹, resultando no valor de CL₅₀ de
269 27,14 mg N-NO₂ L⁻¹, nível esse bem menor quando comparado aos estágios Z₅ e Z₈ de 47,79 e
270 80,52 mg N-NO₂ L⁻¹, respectivamente, no mesmo período (Tabela 3). E em 96 h, a CL₅₀ de
271 3,28 mg N-NO₂ L⁻¹ no Z₂ foi menor que a maioria das outras espécies pesquisadas, com
272 exceção a larvas Z₁ de *P. monodon* (2,88 mg N-NO₂ L⁻¹) (Chen & Chin 1988).

273 Comparando a CL₅₀ de 3,28 mg N-NO₂ L⁻¹ para larvas Z₈ de *M. carcinus* em 96 h, pode-
274 se dizer que foi maior do que 2,88 mg L⁻¹ em larvas Z₁ de *Penaeus monodon* (Chen & Chin
275 1988) e menor que 8,6 e 25,54 mg L⁻¹ em larvas de *M. rosenbergii* (Armstrong *et al.* 1978) e
276 em larvas Z₃ de *S. serrata* (Seneriches-Abiera *et al.* 2007), respectivamente (Tabela 4).

277 Todas essas comparações das CL₅₀ de vários crustáceos com as do camarão pitu
278 demonstram que o *M. carcinus* apresenta tolerância satisfatória à amônia e ao nitrito,
279 evidenciando a necessidade de cuidados especiais para evitar o acúmulo desses compostos
280 nos tanques de larvicultura, principalmente no início do desenvolvimento larval.

281 Neste estudo, as CL₅₀ de N-NO₂ foram menores do que a de NAT na maior parte dos
282 estágios avaliados. Isto sugere que as larvas de pitu são mais tolerantes à amônia, exceto no
283 Z₈, onde as larvas apresentaram uma maior resistência ao nitrito (Tabela 2 e 3). A maior

284 tolerância à amônia também foi observada em larvas de *M. rosenbergii*, visto que as CL_{50} , em
285 96 h, foram 12 mg NAT L^{-1} e 8,6 mg N-NO₂ L^{-1} (Armstrong *et al.* 1976, 1978). Já em juvenis
286 de *Litopenaeus vannamei* as CL_{50} , em 96 h, foram bem próximas, sendo estimada em 9,33 mg
287 N-amônia L^{-1} e 9 mg N-nitrito L^{-1} (Li *et al.* 2007; Gross *et al.* 2004). Em náuplios de artêmia
288 a tolerância ao nitrito foi bem maior do que à amônia, visto que, em 48 h as CL_{50} foram 334,7
289 mg NAT L^{-1} e 1.141,0 mg N-NO₂ L^{-1} (Chen *et al.* 1989).

290

291 CONCLUSÕES

292 Com base na concentração letal em 96 h, pode-se concluir que a tolerância das larvas de
293 *M. carcinus* à amônia e ao nitrito aumenta com o desenvolvimento larval e os níveis de
294 segurança foram estimados em 0,834 mg L^{-1} de NAT (0,05 mg L^{-1} de N-NH₃) e 0,328 mg L^{-1}
295 de N-NO₂, para todo o processo de larvicultura do *M. carcinus*.

296

297 AGRADECIMENTOS

298 À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, pela
299 concessão da bolsa de estudos a R. S. Gomes Jr. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento
300 Científico e Tecnológico – CNPq e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado
301 de Pernambuco – FACEPE, pelo apoio financeiro. R. O. Cavalli é bolsista do CNPq.

REFERÊNCIAS

- ARMSTRONG, D.A.; CHIPPENDALE, D.; KNIGHT, A.W. & COLT, J.E. (1978) Interaction of ionized and un-ionized ammonia on short-term survival and growth of prawn larvae, *Macrobrachium rosenbergii*. *Biology Bull* **154**, 15-31.
- 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.
- BARBIERI, E. (2010) Acute toxicity of ammonia in white shrimp (*Litopenaeus schmitti*) (Burkenroad, 1936, Crustacea) at different salinity levels. *Aquaculture* **306**, 329–33.
- BOWLES, D.E.; AZIZ, K. & KNIGHT, C.L. (2000) *Macrobrachium* (Decapoda: Caridea: Palaemonidae) in the contiguous United States: a review of species and an assessment of threats to their survival. *Journal of Crustacean Biology* **20**, 158-171.
- BOWER, C.E. & BIDWELL, J. (1978) Ionization of ammonia in seawater: effects of temperature, pH, and salinity. *J. Fish Res. Board Can.* **35**, 1012–1016.
- CAVALLI, R.O. ; BERGHE, E.V.; LAVENS, P. ; THUY, N.T. T. ; WILLE, M. & SORGELOOS, P. (2000) Ammonia toxicity as a criterion for the evaluation of larval quality in the prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **125**, 333-343.
- CHEN, J.C. & CHENG, S.Y. (1993) Haemolymph osmolality, acid-base balance and shift of ammonotelic to urotelic excretory pattern of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology* **106/3**, 733-737.

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**, 143-148.

CHEN, J.C. & KUO, Y.Z. (1992) Effects of ammonia on growth and molting of *Penaeus japonicus* juveniles. *Aquaculture* **104**, 249-260.

CHEN, J.C. & LAI, S.H. (1992) Oxygen consumption and ammonia-N excretion of *Penaeus japonicus* adolescents exposed to ambient ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology* **102/1**, 129-133.

CHEN, J.C.; CHEN, K.J. & LIAO, J.M. (1989) Joint action of ammonia and nitrite on *Artemia nauplii*. *Aquaculture* **77**, 329–336.

CHEN, J.C.; LIU, P.C. & NAN, F.H. (1991) Acute toxicity ammonia to larvae *Metapenaeus sensis*. *Asian Fish Science* **4**, 41-51.

COELHO, P.A.; PORTO, M.R. & SOARES, C.M.A. (1982) Biologia e cultivo de camarões de água doce. *Série Aquicultura*, Recife, PE: UFPE **1**, 58.

EPA, (1985) Acute toxicity test for estuarine and marine organisms (shrimp 96-hour acute toxicity test). EPA-540/9-85-010.

EPIFANIO, C.E. & SRNA, R.F. (1975) Toxicity of ammonia, nitrite ion, nitrate ion, and orthophosphate to *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.* **33**, 241-246.

FIGUEROA-LUCERO, G.; HERNÁNDEZ-RUBIO, M.C. & GUTIÉRREZ-LADRÓN DE GUEVARA M.J. (2012) Acute toxicity of ammonia on *Macrobrachium tenellum* (SMITH) larvae. *Rev. Int. Contam. Ambie.* **28/2**, 145-150.

GREENBERG, A.E.; CLESCERI, L.S. & EATON, A.D. (1992) Standard methods for the examination of water and wastewater (18th Ed.). Washington, USA: American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation.

GROSS, A.; ABUTBUL, S. & ZILBERG, D. (2004) Acute and Chronic Effects of Nitrite on White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, Cultured in Low-Salinity Brackish Water. *Journal of the World Aquaculture Society* **35**/3.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C. & THURSTON, R.V. (1977) Trimmed Spearman Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* **11**, 714-719.

HASAN, M.R. & MACINTOSH, D.J. (1986) Acute toxicity of ammonia to common carp fry. *Aquaculture* **54**, 97-107.

HERMAN, F.; FIEVET, E & BOUCHER, P. (1999) Potentialités et intérêts de l'élevage larvaire de la crevette d'eau douce indigène *Macrobrachium carcinus* (L.) (Palaemonidae) aux Antilles françaises. *Bull. Fr. Pêche Piscic.* **352**, 81-90.

IBAMA (2004) Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Instrução Normativa nº 5, de 21 de maio de 2004.

KIR, M.; KUMLU, M. & EROLDGAN, O.T. (2004) Effects of temperature on acute toxicity of ammonia to *Penaeus semisulcatus* juveniles. *Aquaculture* **241**, 479–489.

LI, E.; CHEN, L.; ZENG, C.; CHEN, X.; YU, N.; LAI, Q. & QIN, J.G. (2007) Growth, body composition, respiration and ambient ammonia nitrogen tolerance of the juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at different salinities. *Aquaculture* **265**, 385–390.

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*. *Mar Biol.* **117**/4, 591–598.

MAGALHÃES, D.P and FERRÃO FILHO, A.S. (2008) A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecol. Bras.* **12**/3, 355-381.

MALLASEN, M. and VALENTI, W.C. (2006) Effect of nitrite on larval development of giant river prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* **261**, 1292-1298.

MANZI, J.J.; MADDOX, M.B.; SANDIFER, P.A. (1977) Algal supplement enhancement in *Macrobrachium rosenbergii* (DE MAN, 1879) larviculture. *Proc. World Maric. Soc.* **8**, 207-223.

MAWATARI, K. & HIRAYAMA, K. (1975) Studies on resistibility of some marine animals a various larval stages to ammonia, nitrite and nitrate. *Buli, Fac. Fish. Nagasaki Univ.* **39**,1-6.

NEEDHAM, A.E. (1961) The problem of methaemocyanin. *Nature*, London, **189**, 306-307.

OSTRENSKY, A. & WASIELSKY, 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.; MARCHIORI, M.A. & POERSCH, L.H. (1992) Toxicidade Aguda da Amônia no Processo Produtivo de Pós-Larvas de *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967. *An. Acad. Bras. Ct.* **64**, 4.

RACOTTA, I.S. & HERRERA, R.H. (2000) Metabolic responses of the White shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **125**, 437-443.

RAND, G.M. & PETROCELLI P.R. (1985) *Fundamentals of aquatic toxicology*. Ed. Taylor & Francis, USA, 666p.

RODRIGUES, R.V.; SCHWARZ, M.H.; DELBOS, B.C. & SAMPAIO, L.A. (2007) Acute toxicity and sublethal effects of ammonia and nitrite for juvenile cobia *Rachycentron canadum*. *Aquaculture* **271**, 553–557.

ROMANO, N. & ZENG, C.S. (2007) Ontogenetic changes in tolerance to acute ammonia exposure and associated gill histological alterations during early juvenile development of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*. *Aquaculture* **266/1**, 246–254.

SENERICHES-ABIERA, M.L.; PARADO-ESTEPA, F. & GONZALES, G.A. (2007) Acute toxicity of nitrite to mud crab *Scylla serrata* (Forsk.) larvae. *Aquaculture Research* **38/14**, 1495–1499.

SPRAGUE, J.B. (1971) Measurement of pollutant toxicity to fish: III. Sublethal effects and “safe” concentrations. *Water Res.* **5**: 245–266.

TABATA, K. (1962) Toxicity of ammonia to aquatic animals with reference to the effect of pH and carbon dioxide. *Bull Tokai Reg. Fish Res. Lab.* **34**, 67–74.

TIMMONS, M.B. & EBELING, J.M. (2007) *Recirculating aquaculture*. Cayuga Aqua Ventures. 975p.

VALENTI, W.C. (1993) Freshwater prawn culture in Brazil. *World aquaculture*, **24/1**, 30-34.

WAJSBROT, N.; GASITH, A.; KROM, M.D. & SAMOCHA, T.M. (1990) Effect of dissolved oxygen and the molt stage on the acute toxicity of ammonia to juvenile green tiger prawn *Penaeus semisulcatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* **9**, 497-504.

WAJSBROT, N.; GASITH, A.; DIAMANT, A. & POPPER, D.M. (1993) Chronic toxicity of ammonia to juvenile gilthead seabream *Sparus aurata* and related histopathological effects. *Journal of Fish Biology* **42**, 321-328.

WHITFIELD, M. (1974) The hydrolysis of ammonium ions in sea water a theoretical study. *J. Mar. Biol. U.K.* **54**, 565-580.

ZHAO, J.H.; LAM, T.J.; GUO, J.Y. (1997) Acute toxicity of ammonia to the early stage-larvae, juveniles of *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards, 1853) (Decapoda: Grapsidae) reared in the laboratory. *Aquaculture Research* **28/7**, 517-525.

ZIN, K.Y. & CHU, C.J. (1991) Acute toxicity of ammonia to *Penaeus japonicus* Bate juveniles. *Aquaculture Fish. Manage.* **22**, 259-263.

Tabela 1. Valores médios (\pm DP) das variáveis físico-químicas em unidades experimentais contendo larvas de *Macrobrachium carcinus* de diferentes estágios (Z_2 - Zoea II; Z_5 - Zoea V; Z_8 - Zoea VIII) expostos a concentrações crescentes de nitrogênio da amônia total (NAT) e do nitrito (N-NO₂), durante 96 horas.

Variáveis	Estágio de desenvolvimento larval		
	Z_2	Z_5	Z_8
NAT			
Temperatura (°C)	28,6 \pm 1,4	29,5 \pm 0,8	28,9 \pm 1,0
Oxigênio Dissolvido (mg L ⁻¹)	5,4 \pm 0,6	4,8 \pm 0,5	5,6 \pm 0,4
Salinidade (mg L ⁻¹)	20,1 \pm 0,1	20,1 \pm 0,1	20,0 \pm 0,1
pH	8,0 \pm 0,1	7,9 \pm 0,1	8,0 \pm 0,1
N-NO₂			
Temperatura (°C)	28,4 \pm 1,8	29,5 \pm 1,1	28,9 \pm 1,3
Oxigênio Dissolvido (mg L ⁻¹)	5,5 \pm 0,5	4,9 \pm 0,3	5,7 \pm 0,6
Salinidade (mg L ⁻¹)	20,0 \pm 0,1	20,1 \pm 0,1	20,0 \pm 0,1
pH	8,1 \pm 0,1	8,0 \pm 0,1	8,0 \pm 0,1

Tabela 2. Concentração letal média (CL₅₀; mg L⁻¹) e intervalos de confiança de 95% (entre parênteses) de nitrogênio da amônia total (NAT) e da amônia não ionizada (N-NH₃) estimados para diferentes estágios larvais (Z₂ - Zoea II; Z₅ - zoea V; Z₈ - zoea VIII) de *Macrobrachium carcinus* após 24, 48, 72 e 96 h de exposição.

Tempo (h)	Forma	Estágio de desenvolvimento larval		
		Z ₂	Z ₅	Z ₈
24	NAT	49,42 ^a (45,04-51,90)	47,82 ^a (45,11-52,50)	63,06 ^b (59,04-66,02)
	N-NH ₃	2,95 ^a (2,69-3,10)	2,45 ^a (2,31-2,69)	3,85 ^b (3,60-4,03)
48	NAT	22,51 ^a (20,09-25,35)	21,52 ^a (20,61-23,41)	32,61 ^b (30,88-33,91)
	N-NH ₃	1,34 ^a (1,2-1,51)	1,10 ^a (1,05-1,20)	1,99 ^b (1,88-2,05)
72	NAT	14,99 ^a (13,74-16,92)	18,63 ^a (17,55-20,53)	18,66 ^a (15,96-21,23)
	N-NH ₃	0,90 ^a (0,82-1,01)	0,95 ^a (0,90-1,05)	1,14 ^a (0,97-1,29)
96	NAT	8,34 ^a (6,69-10,25)	13,84 ^{ab} (9,13-18,06)	15,03 ^b (14,27-15,81)
	N-NH ₃	0,50 ^a (0,40-0,61)	0,71 ^{ab} (0,47-0,92)	0,92 ^b (0,87-0,96)

Letras distintas na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Tabela 3. Concentração letal média (CL₅₀; mg L⁻¹) e intervalos de confiança de 95% (entre parênteses) de nitrogênio do nitrito (N-NO₂) estimado para diferentes estágios larvais (Z₂ - Zoea II; Z₅ - zoea V; Z₈ - zoea VIII) de *Macrobrachium carcinus* após 24, 48, 72 e 96 h de exposição.

Tempo (h)	Estágio de desenvolvimento larval		
	Z ₂	Z ₅	Z ₈
24	294,16 ^c (280,70 – 318,92)	116,97 ^a (113,78 – 118,59)	135,48 ^b (127,40 – 146,27)
48	27,14 ^a (16,70 – 40,30)	47,79 ^a (30,20 – 60,15)	80,52 ^b (69,89 – 93,14)
72	11,78 ^a (3,87 – 22,38)	39,45 ^b (30,29 – 50,41)	39,63 ^b (35,63 – 42,20)
96	3,28 ^a (0,51 – 7,02)	9,73 ^b (8,60 – 11,87)	34,00 ^c (31,46 – 37,11)

Letras distintas na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$)

Tabela 4. Concentração letal (CL₅₀; mg L⁻¹) e níveis seguros (mg L⁻¹) de nitrogênio da amônia total (NAT) e do nitrito (N-NO₂) estimados para diferentes estágios larvais de várias espécies de crustáceos.

Espécie e estágios larvais	CL ₅₀ (h)	Nível de segurança	Referências
TAN			
<i>M. rosenbergii</i> , Z	12.0 ¹ (96)	1.20	Armstrong <i>et al.</i> (1978)
<i>P. paulensis</i> , Z	9.4 (96)	0.94	Ostrensky e Wasielesky (1995)
<i>M. carcinus</i> , Z ₂	8.34 (96)	0.834	Este estudo
<i>P. japonicus</i> , Z ₁	6.1 (96)	0.61	Lin <i>et al.</i> (1993)
<i>M. tenellum</i> , Z	13.07 (72)	1.30	Figuroa-Lucero <i>et al.</i> (2012)
<i>E. sinensis</i> , Z ₂	5.7 (72)	0.57	Zhao <i>et al.</i> (1997)
N-NO₂			
<i>S. serrata</i> , Z ₃	25.54 (96)	2.55	Seneriches-Abiera <i>et al.</i> (2007)
<i>M. rosenbergii</i> , Z	8.6 (96)	0.86	Armstrong <i>et al.</i> (1976)
<i>M. carcinus</i> , Z ₂	3.28(96)	0.382	Este estudo
<i>P. monodon</i> , Z ₁	2.88 ² (96)	0.28	Chen e Chin (1988)

¹Valor estimado do gráfico de CL₅₀ em larvas de *Macrobrachium rosenbergii*, em pH de 8,34.

²Valor estimado baseado nas CL₅₀ em 24 e 96 h, em pós-larva de *P. monodon*.

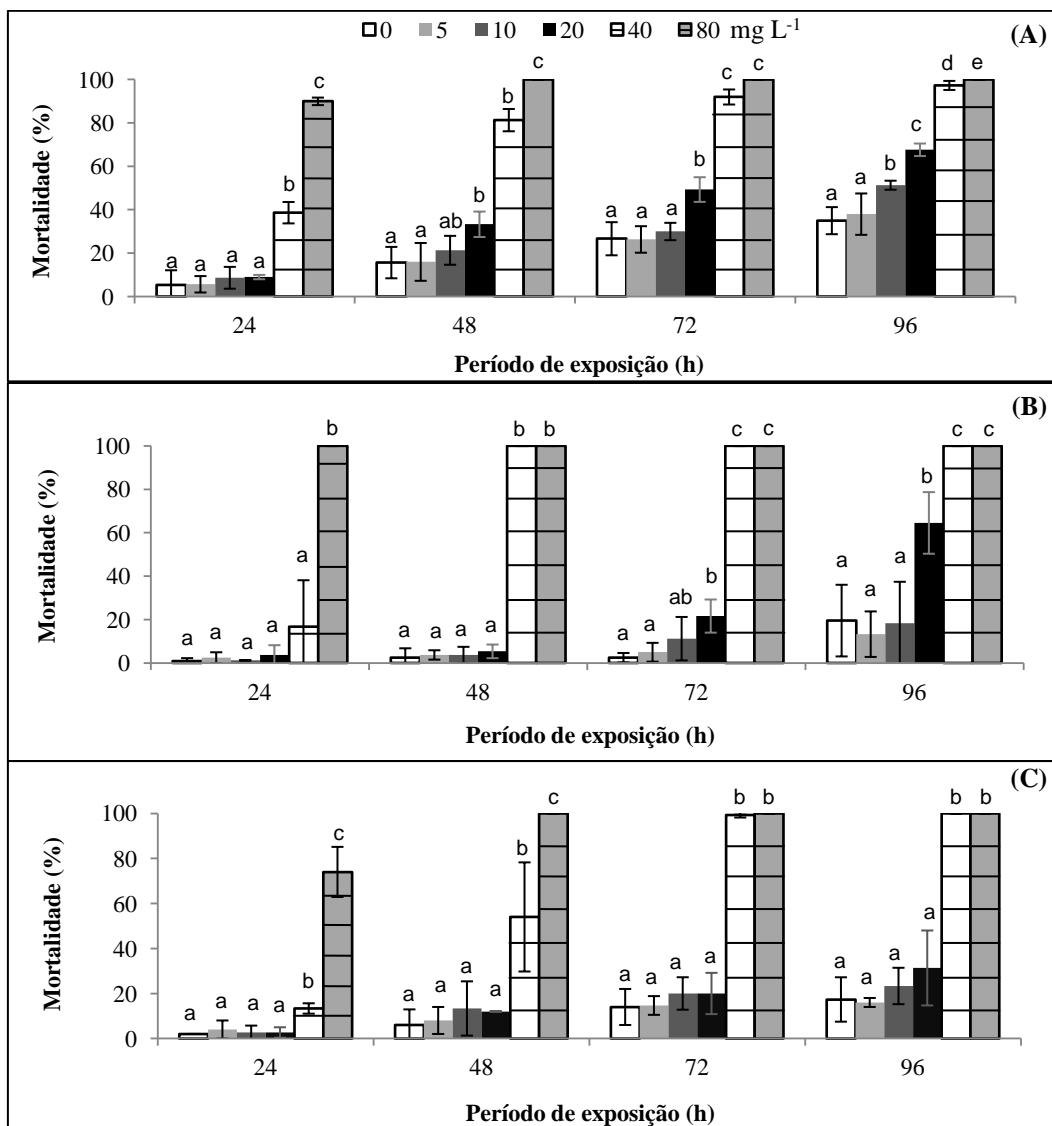


Figura 1 Média (\pm DP) da mortalidade cumulativa (%) de larvas de *Macrobrachium carcinus* nos estágios Z₂ (A), Z₅ (B) e Z₈ (C) expostas a concentrações crescentes de nitrogênio da amônia total durante 24, 48, 72 e 96 h. Letras distintas no mesmo período de exposição indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

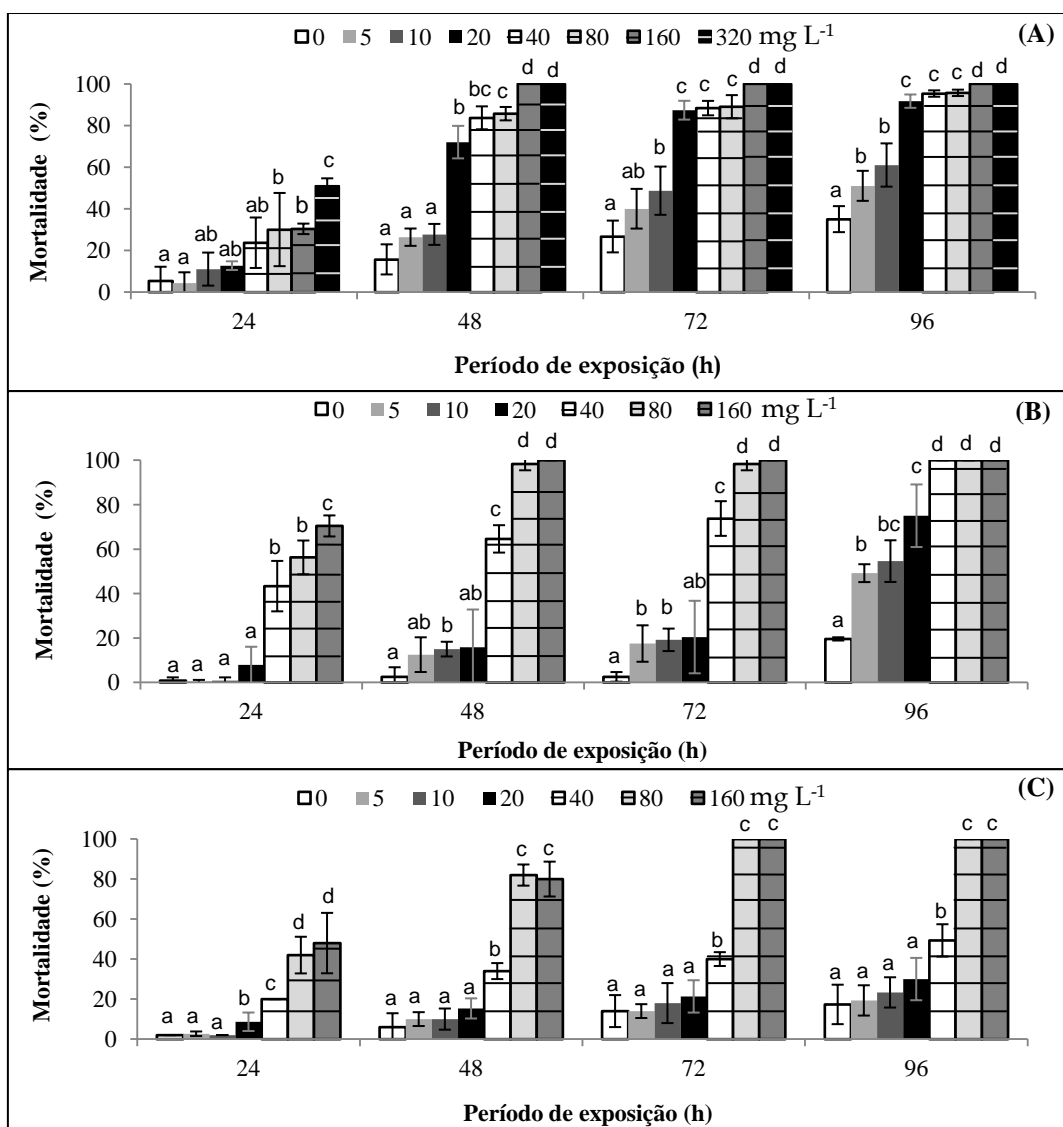


Figure 2 Média (\pm DP) da mortalidade cumulativa (%) de larvas de *Macrobrachium carcinus* nos estágios Z₂ (A), Z₅ (B) e Z₈ (C) expostas a concentrações crescentes de nitrogênio do nitrito durante 24, 48, 72 e 96 h. Letras distintas no mesmo período de exposição indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

4.2- Normas da Revista Aquaculture Research

MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

Edited By: Ronald W. Hardy, Lindsay Ross, Shi-Yen Shiau and Marc Verdegem

Impact Factor: 1.422

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2012: 23/50 (Fisheries)

Online ISSN: 1365-2109

Format

All sections of the typescript should be on one side of A4 paper, double-spaced and with 30mm margins. A font size of 12pt should be used. Line numbering should be included, with numbering to continue from the first line to the end of the text (reference list). Line numbers should be continuous throughout the manuscript and NOT start over on each page.

Articles are accepted for publication only at the discretion of the Editors. Authors will be notified when a decision on their paper is reached.

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language must have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. It is preferred that manuscripts are professionally edited. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp.

Japanese authors can also find a list of local English improvement services at <http://www.wiley.co.jp/journals/editcontribute.html>. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication. Manuscripts in which poor English makes it difficult or impossible to review will be returned to authors without review.

Units and spelling: Systeme International (SI) units should be used. The salinity of sea water should be given as gL⁻¹. Use the form gmL⁻¹ not g/ml. Avoid the use of g per 100 g, for example in food composition, use g kg⁻¹. If other units are used, these should be defined on first appearance in terms of SI units, e.g. mmHg. Spelling should conform to that used in the *Concise Oxford Dictionary* published by Oxford University Press. Abbreviations of chemical and other names should be defined when first

mentioned in the text unless they are commonly used and internationally known and accepted.

Scientific Names and Statistics: Complete scientific names, including the authority with correct taxonomic disposition, should be given when organisms are first mentioned in the text and in tables, figures and key words together with authorities in brackets, e.g. 'rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)' but 'Atlantic salmon *Salmo salar* L.' without brackets. For further information see American Fisheries Society Special Publication No. 20, *A List of Common and Scientific Names of Fishes from the United States and Canada*.

Carry out and describe all appropriate statistical analyses.

Structure

A manuscript (original article) should consist of the following sections:

Title page:

This should include:

- the full title of the paper
- the full names of all the authors
- the name(s) and address(es) of the institution(s) at which the work was carried out (the present address of the authors, if different from the above, should appear in a footnote)
- the name, address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the author to whom all correspondence and proofs should be sent
- a suggested running title of not more than 50 characters, including spaces
- four to six keywords for indexing purposes

Main text:

Generally, all papers should be divided into the following sections and appear in the order: (1) Abstract or Summary, not exceeding 150-250 words, (2) Introduction, (3) Materials and Methods, (4) Results, (5) Discussion, (6) Acknowledgments, (7) References, (8) Figure legends, (9) Tables, (10) Figures.

The Results and Discussion sections may be combined and may contain subheadings. The Materials and Methods section should be sufficiently detailed to enable the experiments to be reproduced. Trade names should be capitalized and the manufacturer's name and location (town, state/county, country) included.

All pages must be numbered consecutively from the title page, and include the acknowledgments, references and figure legends, which should be submitted on separate sheets following the main text. The preferred position of tables and figures in the text should be indicated in the left-hand margin.

Optimizing Your Abstract for Search Engines

Many students and researchers looking for information online will use search engines such as Google, Yahoo or similar. By optimizing your article for search engines, you will increase the chance of someone finding it. This in turn will make it more likely to be viewed and/or cited in another work. We have compiled [these guidelines](#) to enable you to maximize the web-friendliness of the most public part of your article.

References (Harvard style)

References should be cited in the text by author and date, e.g. Lie & Hire (1990). Joint authors should be referred to in full at the first mention and thereafter by *et al.* if there are more than two, e.g. Lie *et al.* (1990).

More than one paper from the same author(s) in the same year must be identified by the letters a, b, c, etc. placed after the year of publication. Listings of references in the text should be chronological. At the end of the paper, references should be listed alphabetically according to the first named author. The full titles of papers, chapters and books should be given, with the first and last page numbers. For example:

Chapman D.W. (1971) Production. In: *Methods of the Assessment of Fish Production in Freshwater* (ed. by W.S. Ricker), pp. 199-214. Blackwell Scientific Publications Ltd, Oxford.

Utting, S.D. (1986) A preliminary study on growth of *Crassostrea gigas* larvae and spat in relation to dietary protein. *Aquaculture* **56**, 123-128.

Authors are responsible for the accuracy of their references. References should only be cited as 'in press' if they have been accepted for publication. Manuscripts in preparation, unpublished reports and reports not readily available should not be cited. Personal communications should be cited as such in the text.

It is the authors' responsibility to obtain permission from colleagues to include their work as a personal communication. A letter of permission should accompany the manuscript.

The Editor and Publisher recommend that citation of online published papers and other material should be done via a DOI (digital object identifier), which all reputable online published material should have – see www.doi.org/ for more information. If an author cites anything which does not have a DOI they run the risk of the cited material not being traceable.

We recommend the use of a tool such as [EndNote](#) or [Reference Manager](#) for reference management and formatting.

EndNote reference styles can be searched for here:

www.endnote.com/support/enstyles.asp

Reference Manager reference styles can be searched for here:

www.refman.com/support/rmstyles.asp

Tables, Figures and Figure Legends

Tables: Tables should be self-explanatory and include only essential data. Each table must be typewritten on a separate sheet and should be numbered consecutively with Arabic numerals, e.g. Table 1, and given a short caption. No vertical rules should be used. Units should appear in parentheses in the column headings and not in the body of the table. All abbreviations should be defined in a footnote.

Figures: Illustrations should be referred to in the text as figures using Arabic numbers, e.g. Fig.1, Fig.2 etc. in order of appearance.

Photographs and photomicrographs should be unmounted glossy prints and should not be retouched. Labelling, including scale bars if necessary, should be clearly indicated. Magnifications should be included in the legend.

Line drawings should be on separate sheets of paper; lettering should be on an overlay or photocopy and should be no less than 4 mm high for a 50% reduction. Please note, each figure should have a separate legend; these should be grouped on a separate page at the end of the manuscript. All symbols and abbreviations should be clearly explained. Avoid using tints if possible; if they are essential to the understanding of the figure, try to make thi coarse.

Preparation of Electronic Figures for Publication: Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (line art) or TIFF

(halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of at least 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). Please submit the data for figures in black and white or submit a Colour Work Agreement Form (see Colour Charges below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible).

For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: line art: >600 dpi; halftones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

Further information can be obtained at Wiley Blackwell's guidelines for figures: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>

Check your electronic artwork before submitting it:

<http://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp>

Permissions: If all or parts of previously published tables and figures are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publisher.

Colour Charges: It is the policy of *Aquaculture Research* for authors to pay the full cost for the reproduction of their colour artwork. Therefore, please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, Wiley Blackwell require you to complete and return a [Colour Work Agreement Form](#) before your paper can be published. **Any article received by Wiley Blackwell with colour work will not be published until the form has been returned.** If you are unable to access the internet, or are unable to download the form, please contact the Production Editor are@wiley.com.

Once completed, please return the form (hard copy with original signature) via regular mail to the address below:

Customer Services (OPI)

John Wiley & Sons Ltd, European Distribution Centre

New Era Estate

Oldlands Way

Bognor Regis

West Sussex

PO22 9NQ

Any article received by Wiley Blackwell with colour work will not be published until the form has been returned.

In the event that an author is not able to cover the costs of reproducing colour figures in colour in the printed version of the journal, Aquaculture Research offers authors the opportunity to reproduce colour figures in colour for free in the online version of the article (but they will still appear in black and white in the print version). If an author wishes to take advantage of this free colour-on-the-web service, they should liaise with the Editorial Office to ensure that the appropriate documentation is completed for the Publisher.

Figure Legends: In the full-text online edition of the Journal, figure legends may be truncated in abbreviated links to the full-screen version. Therefore, the first 100 characters of any legend should inform the reader of key aspects of the figure.