Toxicidade Aguda da Amônia no Processo Produtivo de Pós-Larvas de *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967

ANTÔNIO OSTRENSKY[1], MARCOS A. MARCHIORI[2] and LUIS HENRIQUE POERSCH[2]

[1]Laboratório de Carcinocultura, Centro de Biologia Marinha, UFPR, 83020-300 Curitiba, PR
[2]Laboratório de Carcinocultura, Departamento de Oceanografia, CP 474, Universidade do Rio Grande, 96200 Rio Grande, RS

Manuscrito recebido em 21 de maio de 1991; aceito para publicação em 02 de junho de 1992
credenciado por JESUS SANTIAGO MOURE

ABSTRACT

Larval shrimp *Penaeus paulensis* showed a tendency to decrease in ammonia tolerance as the larva metamorphosed from nauplius to postlarvae stage. The 24-h LC50 were 4.04, 1.70, 2.72, and 1.42 mg/l NH_3-N on nauplii, zoea, mysis and postlarvae, respectively. The zoea stage and the initial postlarvae substages were very susceptible to ammonia. The 96-h LC50 values on zoea and postlarvae were 0.69 mg/l and 0.32 mg/l, against 0.80 mg/l NH_3-N on mysis. The eggs of *Penaeus paulensis* were very affected by ammonia, which provoked a progressive decrease in the hatching rate and induced morphological deformities in hatched nauplii. A "safe level" of ammonia was estimated at 0.032 mg/l NH_3-N on the basis of 24-h LC50 for eggs.

Key words: toxicidade, *Penaeus paulensis*, amônia

INTRODUÇÃO

A amônia é o principal composto nitrogenado excretado por peixes (Hillaby & Randall, 1979) e crustáceos (Kinne, 1976), porém o seu acúmulo, tanto em ambiente natural como em tanques de cultivo, pode vir a afetar diretamente a fauna que habita estes ambientes (Doudoroff & Katz, 1950; Ankley *et al.*, 1990).

Em solução aquosa há um equilíbrio entre as formas iônica (NH_4^+) e não-ionizada ou gasosa (NH_3) da amônia, sendo que a primeira forma predomina neste equilíbrio, que é diretamente afetado pelo pH, temperatura, salinidade e pressão (Whitfield, 1974; Emerson *et al.*, 1975).

Atualmente existe quase uma unanimidade por parte dos pesquisadores, em afirmar que a forma tóxica para a vida aquática é a não-ionizada e que a forma iônica tem efeito tóxico reduzido ou mesmo desprezível (Ball, 1967; Smart, 1976; Thurston, 1980; Poxton & Allouse, 1982; Eifac, 1983). Porém, Armstrong *et al.*, (1978) concluíram que em pH neutro ou ácido, a forma iônica seria principal responsável pela toxicidade da amônia para larvas *Macrobrachium rosenbergii*.

Em ambientes de cultivo, principalmente nos modernos sistemas de larvicultura que utilizam a recirculação de água, organismos heterotróficos mineralizam a matéria orgânica provinda da excreção dos animais cultivados e de restos alimentares não consumidos. Isto induz a um aumento considerável dos compostos inorgânicos, especialmente da amônia (Perfettini & Bianchi, 1990). Mevel & Chamroux (1981) estudaram os efeitos da estabilização de um circuito fechado para criação de camarões (*Penaeus japonicus*) e

reportaram que a amônia atingiu cerca de 1000 µtg/l, ocasionando a morte dos organismos mantidos neste sistema.

O presente trabalho analisa a toxicidade da amônia na larvicultura de *P. paulensis*, buscando fornecer subsídios para a maximização do sistema de produção de pós-larvas desta espécie, que tem uma destacada importância comercial em toda a região Sul do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Camarões sexualmente maturos foram coletados no litoral de Santa Catarina, Brasil, através do navio oceanográfico "Atlântico Sul". Depois, foram transportados e mantidos sob condições ambientais controladas no Laboratório de Carcinocultura da Universidade do Rio Grande, RS. As fêmeas foram submetidas à ablação unilateral do pedúnculo ocular, como forma de indução ao desenvolvimento gonadal (Crocos & Kerr, 1986). As desovas e a larvicultura foram realizadas em caixas plásticas de 250 l.

Os experimentos foram realizados em frascos de vidro de 200 ou 500 ml, contendo entre 6 e 10 concentrações de amônia e um controle, todos testados em duplicata. Em cada recipiente foram colocados 30 indivíduos, com exceção das pós-larvas que foram testadas em número de 20 por tratamento. Os testes com cada estágio larval foram repetidos por 3 a 6 vezes para que se pudesse verificar a repetibilidade dos resultados.

Todos os organismos testados encontravam-se, no início dos testes, no primeiro subestágio de cada estágio larval. As larvas eram coletadas dos tanques de larvicultura e colocadas em aquários de vidro para aclimatação, de onde eram retiradas aleatoriamente e transferidas para os frascos contendo as soluções-teste de amônia. Somente no caso dos ovos esta coleta não foi aleatória, pois só foram submetidos à experimentação aqueles ovos que haviam comprovadamente sido fertilizados. Tal procedimento foi necessário para impedir que uma possível taxa elevada de ovos não fertilizados viessem a ocasionar erros de estimação dos efeitos tóxicos da amônia.

As soluções-teste foram preparadas a partir da dissolução de cloreto de amônio em água do mar previamente filtrada para eliminação de partículas com tamanho superior a 1,0 µm. A salinidade foi regulada em 28°/oo e os frascos tapados com papel alumínio e transferidos para uma incubadora tipo DBO. A temperatura foi de 25 (± 0,2)°C, o fotoperíodo de 12h Luz: 12h Escuro e a intensidade luminosa de 2000 lux. Todos os tratamentos foram constantemente aerados durante os testes.

As soluções foram periodicamente monitoradas para quantificação das variações de pH (a partir de um potenciômetro Digimed DMPHPA) e de amônia total (seguindo-se o método descrito por Solorzano, 1969).

Todos os meios foram renovados em 100% a cada 24h, ocasiões onde o número de organismos mortos em cada tratamento era registrado. As larvas foram consideradas mortas quando não apresentavam qualquer tipo de movimento nem reações a um estímulo físico com uma micro pipeta de Pasteur. Após estas renovações foi ainda fornecido o alimento. As zoéas foram alimentadas com o fitoflagelado *Tetraselmis chuii*; as misis e pós-larvas com artêmia recém eclodida; somente os náuplios não foram alimentados, pois ainda se nutrem de seu próprio vitelo.

As CL's50, bem como seu intervalo de 95% de confiança, foram calculadas com base no programa "Probit Analysis", desenvolvido pelo Pe. Jesus Santiago Moure, pertencente ao Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná.

Os termos utilizados neste trabalho são:

Amônia — amônia total inorgânica (NH_3 + NH_4^+)

NH_3 — amônia não-ionizada ou gasosa

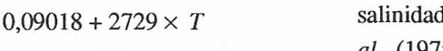
NH_4^+ — amônia na forma iônica

N-NH_3 — Nitrogênio amoniacal na forma gasosa

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CÁLCULO DA AMÔNIA NÃO-IONIZADA

O equilíbrio existente entre NH_3 e NH_4^+ em uma solução aquosa pode, simplificadamente, ser expresso por:



$$NH_4^+ + H_2O \rightarrow NH_3 + H_3O^+$$

Segundo Emerson *et al.*, (1975), a fração de NH_3 em relação a amônia total é calculada por:

$$[NH_3] = \frac{[\text{ amônia total }]}{1 + 10^{(pKa - pH)}}$$

onde pKa = – log Ka (a constante de dissociação ácida do íon NH_4^+).

Quando se trabalha com água doce não há qualquer problema na determinação desta fração, pois o valor de pK_a é facilmente calculado, segundo os autores, pela fórmula:

$$pKa = 0{,}09018 + 2729 \times T$$

onde T é a temperatura, em °K.

Quando se trata de água salgada, uma outra variável deve ser considerada, a força iônica.

Whitfield (1974) apresentou uma série de modelos teóricos sobre os efeitos da interação iônica no cálculo da hidrólise dos íons amônio em água do mar, porém fica a critério de cada pesquisador decidir por qual destes modelos optar. Isto levou muito deles a procurar os valores tabelados por Bower & Bidwell (1978) para as percentagens de NH_3 em determinadas faixas de salinidade. Tais tabelas, por utilizarem limites de salinidade e não valores específicos, podem ocasionar erros de estimação da fração exata de NH_3.

Os modelos sugeridos por Whitfield (1974) foram baseados em uma temperatura de 25°C e 1 atmosfera e, resumidamente, assumem que:

Modelo 1. O coeficiente médio de atividade iônica de qualquer elemento na água do mar é idêntico ao observado para uma solução de mesma força iônica contendo apenas este elemento.

Modelo 2. O coeficiente médio de atividade iônica dos elementos menores pode ser comparado ao coeficiente de atividade destes elementos em soluções de cloreto de sódio de mesma força iônica.

Modelo 3. O coeficiente de atividade dos elementos-traço em uma mistura contendo cloretos de todos os elementos maiores (Na^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, K^+), pode ser calculado pelo modelo eletrolítico de Bronsted-Guggenheim ou pelo modelo de expansão integral (Whitfield, 1973), desde que a água esteja livre de sulfatos.

Modelo 4. Idêntico ao modelo anterior, porém assume que não há interferência dos sulfatos.

Para cada um destes modelos teóricos o autor apresentou uma tabela contendo valores para pK_a^s em soluções de diferentes salinidades. As equações obtidas pela regressão linear entre estes pontos, seguida pela comparação com resultados apresentados por Bower & Bidwell (1978), para salinidades superiores a 18°/00, e por Emerson *et al.*, (1975) e Erickson (1985), para uma água com salinidade zero, indicou que o Modelo 3 proposto por Whitfield (1974) foi o mais preciso, em termos do cálculo da fração gasosa da amônia.

Segundo Whitfield (1974) o valor de pK_a em função de uma determinada temperatura ($pK_a(T)$) seria:

$$pK_a(T) = pK_a^s + 0{,}0324 \times (298 - (273 + T))$$

onde T é a temperatura em graus Celsius (°C). pK_a^s é, por sua vez, a componente iônica para cálculo dos efeitos da salinidade na dissociação dos íons amônio e pode ser calculada pela equação obtida a partir da regressão linear entre os valores tabelados no Modelo 3:

$$pK_a^s = 9{,}2516 + 0{,}153 \times F$$

onde F é a Força iônica, que pode ser diretamente calculada a partir da salinidade:

$$F = 19{,}9273 \times S/(1000 - (1{,}005109 \times S))$$

onde S é a salinidade.

A grande vantagem destas fórmulas é que eliminam o uso de tabelas e podem ser utilizadas para quaisquer valores de temperatura, salinidade e pH.

TOXICIDADE DE AMÔNIA PARA OVOS DE *P. PAULENSIS*

Observou-se que a amônia foi bastante tóxica para os ovos de *Penaeus paulensis*, em relação aos estágios larvais (Figura 1). A CL50 obtida foi de 0,36 mg/l de N-NH_3. Porém deve ser ressaltado que acima de 0,25 mg/l de N-NH_3, uma série de anormalidades ocorrem. Primavera & Posadas (1981), apesar de não fazerem qualquer referência à qualidade da água, apresentaram, de forma concisa, anormalidades morfológicas que constatou-se, no presente caso, serem reflexo de ovos expostos a compostos nitrogenados (amônia e nitrito). Entretanto, não deve ser descartada a hipótese de outros produtos químicos virem a provocar deformações semelhantes.

Entre concentrações de 0,28 e 0,86 mg/l de N-NH_3 uma grande percentagem de náuplios eclodiram apresentando desaparecimento parcial ou mesmo total das setas dos apêndices e da furca, o que podia ser observado mesmo antes da eclosão (ovos descritos como tipo A_2, por Primavera e Posadas *op. cit.* Em concentrações de 1,72 mg/l de N-NH_3 não houve eclosão, mas alguns náuplios bastante deformados (assemelhando-se ao tipo B, descrito pelas autoras) ficaram vivos dentro dos ovos por cerca de 48h. Acima de 2,8 mg/l de N-NH_3 nenhum dos ovos completou as divisões mitóticas necessárias para formar um náuplio.

TOXICIDADE DE AMÔNIA PARA AS LARVAS DE *P. PAULENSIS*

Comprovando que o surgimento de anormalidades não foi um fato aleatório, a exposição de náuplios normais à amônia também ocasionou o mesmo tipo de problemas que os verificados para os ovos. As CL's50 para os náuplios em 24, 48 e 72h foram de, respectivamente, 4,04, 1,65, 1,01 mg/l de N-NH_3. Este foi o estágio larval mais resistente à amônia (Tabela I).

Houve uma tendência à diminuição na tolerância à amônia ao longo do desenvolvimento larval, contrariando os resultados obtidos para algumas espécies (Jayasankar & Muthu, 1983; Chin & Chen, 1987). As CL's 50 24h, para zoéas, misis e pós-larvas foram de, respectivamente, 1,70, 2,72 e 1,42 mg/l de N-NH_3. Em 96h estas concentrações letais médias passaram, pela ordem, para 0,69, 0,80 e 0,32 mg/l de N-NH_3.

Apesar de não estar descartada a ocorrência de erros experimentais, pode-se afirmar que a

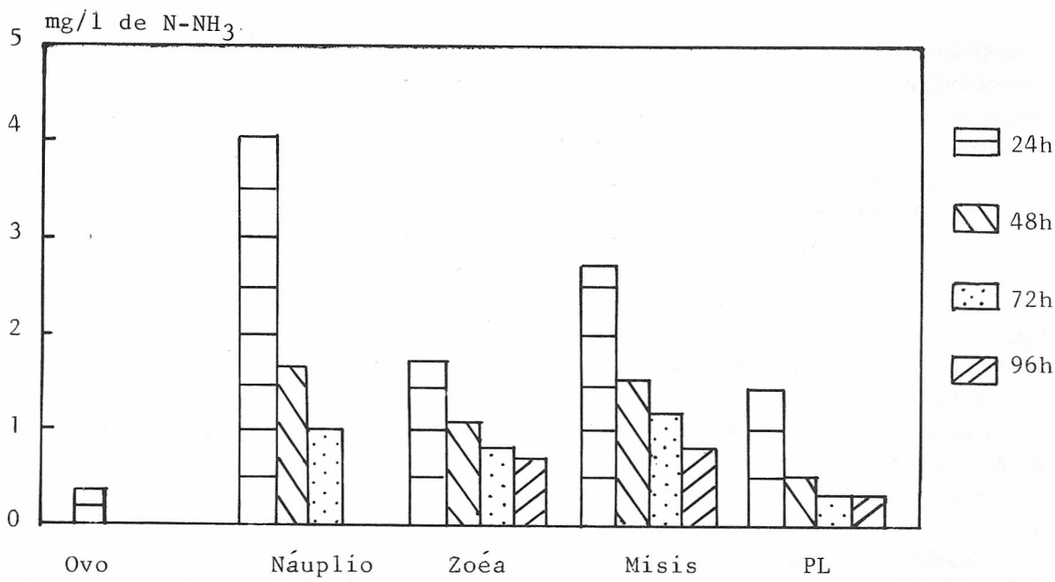


Fig. 1 — CL's50 de nitrogênio na forma de amônia gasosa, para larvas de *Penaeus paulensis*.

TABELA I

CL's50 (em mg/l) e seus limites de 95% de confiança (entre parênteses) do nitrogênio na forma de amônia total ($N-(NH_3 + NH_4^+)$), e na forma de amônia gasosa, $N-NH_3$, na larvicultura de *Penaeus paulensis*.

Estágio	Forma	Tempo de exposição 24h	48h	72h	96h
Ovo	Amônia	6,25	—	—	—
		(5,10–7,60)	—	—	—
	$N-NH_3$	0,36	—	—	—
		(0,29–0,44)	—	—	—
Náuplio	Amônia	102,3	41,80	25,59	—
		(93,1–112,3)	(37,2–51,2)	(17,3–44,6)	—
	$N-NH_3$	4,04	1,65	1,01	—
		(3,68–4,44)	(1,47–2,03)	(0,68–1,76)*	—
Zoéa	Amônia	22,93	14,53	10,94	9,39
		(16,0–29,0)	(10,2–20,6)	(7,4–19,3)	(6,3–16,5)
	$N-NH_3$	1,70	1,08	0,81	0,69
		(1,19–2,15)	(0,76–1,53)	(0,55–1,43)	(0,47–1,22)
Misis	Amônia	74,87	41,80	32,85	21,98
		(66,6–84,3)	(34,2–51,1)	(25,2–44,7)	(14,4–38,8)
	$N-NH_3$	2,72	1,52	1,19	0,80
		(2,41–3,06)	(1,24–1,85)	(0,91–1,62)	(0,52–1,41)
PL	Amônia	24,19	8,59	5,65	5,49
		(19,6–26,2)	(7,63–9,64)	(4,06–7,86)	(4,52–6,63)
	$N-NH_3$	1,42	0,50	0,33	0,32
		(1,15–1,54)	(0,45–0,57)	(0,24–0,46)	(0,27–0,39)

probabilidade de terem existido é muito remota, visto que cada estágio larval foi testado em duplicata e que os resultados só foram aceitos quando repetidos por três vezes. É importante citar que Mawatari & Hirayama (1975) também observaram a mesma tendência para estágios larvais de *P. japonicus* e *P. orientalis* e concluiram que, devido ao fato de se alimentarem de vitelo, os náuplios teriam uma maior independência do meio externo, suportando mais as variações ambientais do que estágios larvais que têm que obter um alimento externo.

Como já discutido, o pH influencia diretamente a quantidade de NH_3 no meio, por outro lado, o alimento fornecido às larvas no estágio de zoéa é fitoplâncton, que, em presença de luz, realiza fotossíntese e ocasiona uma elevação de pH, como pode ser constatado pela análise dos valores médios de pH ao longo dos testes (Tabela II). Isso faz com que em uma das fases mais sensíveis à amônia, em toda larvicultura de *P. paulensis*, ocorra a maior percentagem de NH_3 em relação a NH_4^+, o que certamente tende a ocasionar perdas significativas de larvas.

Wajsbrot *et al.*, (1990) encontraram correlação entre os períodos de muda na toxicidade da amônia para juvenis de *P. semisulcatus*, e afirmaram que tal correlação não poderia ser automaticamente extrapolada para os estágios larvais, uma vez que a cutícula das larvas é muito mais fina e permeável que a dos juvenis. Apesar disto, observou-se uma alta taxa de mortalidade de pós-larvas de *P. paulensis* durante a muda, o que pode indicar uma maior sensibilidade à amônia durante estes períodos e explicar os baixos valores das CL's50 verificadas para pós-larvas.

As CL's50 calculadas para larvas de *P. paulensis* foram superiores a quase todas as encontradas para os estágios larvais de *P. monodom*

TABELA II
Valores médios de pH durante os testes de toxicidade de amônia para larvas de *P. paulensis*.

Estágio	Número de Tratamentos	pH
Ovo	22	8,02
Náuplio	35	7,95
Zoéa	48	8,24
Misis	38	7,92
PL	41	8,10

(Chin & Chen, 1987). Apenas no estágio de pós-larva é que *P. paulensis* foi consideravelmente mais susceptível à amônia (CL50 24h de 2,50 mg/l de N-NH_3 para *P. monodom* contra 1,42 mg/l para *P. paulensis*). Wickins (1976), calculou que o valor médio de CL50 48h para juvenis de várias espécies de camarões peneídeos foi de 1,29 mg/l de N-NH_3. *P. paulensis* apresentou um valor médio para a CL50 48h ao longo dos estágios larvais de 1,19 mg/l. Armstrong *et al.*, (1978) quantificaram em 1,0 mg/l de N-NH_3 o valor médio da CL50 96h da amônia para larvas de *Macrobrachium rosenbergii*, em pH de 7,6. No presente caso o valor médio de CL50 96h obtido para os estágios larvais de *P. paulensis* foi de 0,705 mg/l de N-NH_3.

Estas comparações visam mostrar que o camarão rosa *P. paulensis* apresenta uma tolerância bastante satisfatória à amônia durante a sua larvicultura. Isto não elimina, entretanto, a necessidade de cuidados especiais para evitar o acúmulo de compostos inorgânicos, como é o caso da amônia e do nitrito, nos tanques de larvicultura.

O nível máximo de um composto tóxico suportado por uma espécie ou população pode ser estimado a partir da multiplicação de um fator de aplicação (0.1) pela CL50 no estágio larval mais sensível ao tóxico (Sprague, 1971). No presente trabalho este nível de segurança foi estimado com base na CL50 calculada para pós-larva em 96h, 0,32 mg/l de N-NH_3 (5,49 mg/l de N-(NH_3 + NH_4^+)). Recomenda-se, então, que a amônia seja mantida em concentrações abaixo de 0,032 mg/l de N-NH_3 (0,55 mg/l de N-(NH_3 + NH_4^+)) nos tanques de larvicultura de *P. paulensis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANKLEY, G. T.; KATKO, A. & ARTHUR, J. M., (1990), Identification of ammonia as an importantant sediment-associated toxican in the lower Fox River and Green Bay, Wisconsin. *Environ. Toxicol. Chem.*, **9:** 313-322.

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*. *Biol. Bull.*, **154:** 15-31.

BALL, I. R., (1967), The relative susceptibilities of some species of fresh-water fish to positions - I. Ammonia. *Water Res.*, **1:** 767-775.

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.

CHIN, T. S. & CHEN, J. C., (1987), Acute toxicity ao ammonia to larvae of the tiger prawn, *Penaeus mondom*. *Aquaculture,* **66:** 247-253.

CROCOS, P. J. & KERR, J. D., (1986), Factor affecting indution of maturation and spawning of the tiger prawn, *Penaeus esculentus* (Haswell), under laboratory condictions. *Aquaculture,* **58:** 203-214.

DOUDOROFF, P. & KATZ, M., (1950), Critical review of literature on the toxicity of industrial wastes and their components to fishes. *Sewage Indust. Wastes,* **22** (11): 1432-1458.

EIFAC, EUROPEAN INLAND FISHERIES ADVISORY COMMISSION, (1983), Water quality criteria for european freshwater fish. *Water Res. Pergamon Press,* **7:** 1011-1022.

EMERSON, K.; RUSSO, R. C.; LUND, R. E. & THURSTON, R. V., (1975), Aqueous ammonia equilibrium calculations: Effects of pH and temperature. *J. Fish. Res. Board Can.,* **32** (12): 2379-2383.

ERICKSON, R. J., (1985), An evolution of mathematical models for the effects of pH and temperature on ammonia toxicity to aquatic organisms. *Water Res.,* **19** (8): 1047-1058.

HILLABY, B. A. & RANDALL, D. J., (1979), Acute ammonia toxicity and ammonia excretion in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Board Can.,* **36:** 621-629.

JAYASANKAR, P. & MUTHU, M. F., (1983), Toxicity of ammonia to the larvae of *Penaeus indicus* H. Milne Edwards. *Indian. J. Fish.,* **30** (1): 1-12.

KINNE, O., (1976), *Marine Ecology* Vol. III, part 1, John Wiley & Sons, N.Y., U.S.A. 577p.

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

MEVEL, G. & CHAMROUX, S., (1981), A study on nitrification in the presence of prawns (*Penaeus japonicus*) in marine closed system. *Aquaculture,* **23:** 29-43.

PERFETTINI, J. & BIANCHI, M., (1990), The comparison of two simple protocols designed to initiate and stimulate ammonia oxidation in closed aquaculture systems. *Aquaculture,* **88:** 179-188.

POXTON, M. G. & ALLOUSE, S. B., (1982), Water quality criteria for marine fisheries. *Aquacutural Engeng.,* **1:** 153-191.

PRIMAVERA J. H. & POSADAS, R. A., (1981), Studies on the egg quality of *Penaeus monodom* Fabricius, based on morfology and hatching rates. *Aquaculture,* **22:** 269-277.

SMART, G., (1976), The effect of ammonia exposure on gill structure of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Biol.,* **8:** 471-475.

SOLORZANO, L., (1969), Determination of ammonia in natural water by phenolhypoclorite method. *Limnol. Oceanogr.,* **14:** 799-801.

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

THURSTON, R. V., (1980), Some factores affecting the toxicity of ammonia to fishes. *EPA Ecological Research EPA-600/9-80-034*, US Environmental Protection Agency, Duluth, MN, pp. 118-137.

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.

WICKINS, J. F., (1976), The tolerance of warm-water prawns to recirculated water. *Aquaculture,* **9:** 19-37.

WHITFIELD, M., (1973), A chemical model for the major electolyte component of seawater based on the Bronsted-Guggenheim hypothesis. *Mar. Chem.,* **1:** 251-266.

WHITFIELD, M., (1974), The hydrolysis of ammonium ions in sea water- A theorical study. *J. mar. biol. Ass. U.K.,* **54:** 565-580.