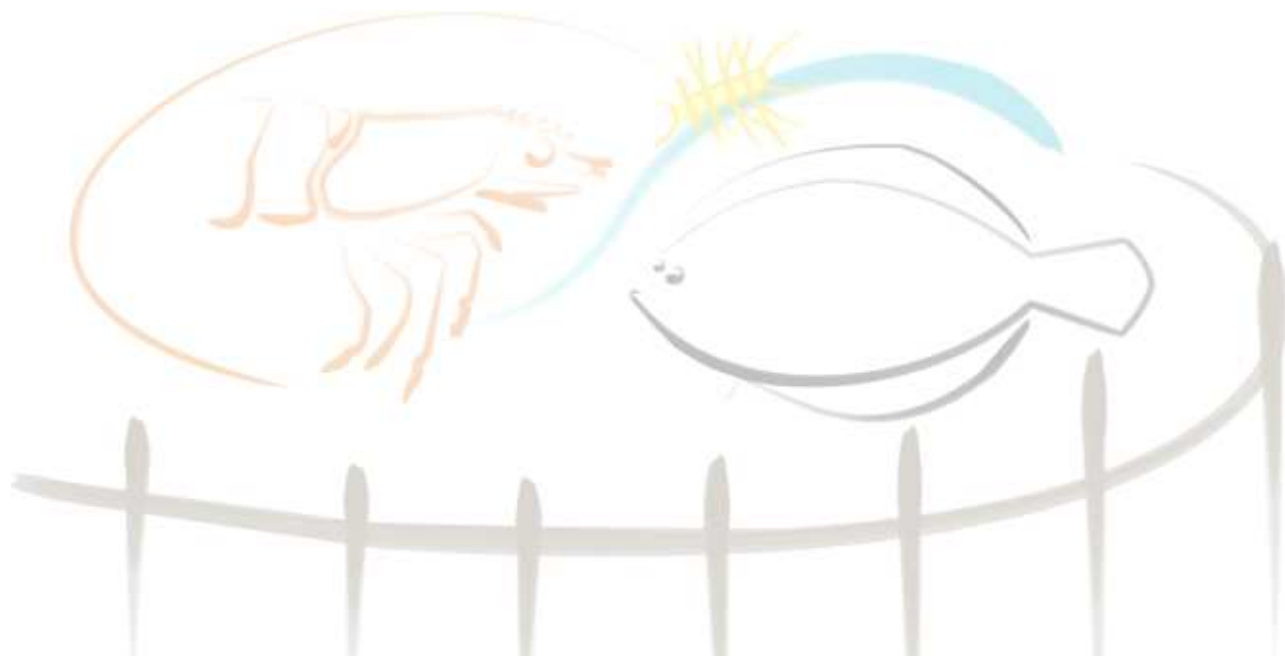




FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



**TOXICIDADE AGUDA DA AMÔNIA E DO
NITRITO PARA JUVENIS DO PAMPO *Trachinotus
marginatus* (CUVIER, 1832) EM DIFERENTES
SALINIDADES.**

LUIZA DY FONSECA COSTA

FURG
RIO GRANDE, RS.
2008

Fundação Universidade Federal do Rio Grande
Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura

**TOXICIDADE AGUDA DA AMÔNIA E DO NITRITO PARA
JUVENIS DO PAMPO *Trachinotus marginatus* (CUVIER, 1832) EM
DIFERENTES SALINIDADES.**

LUIZA DY FONSECA COSTA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do grau de mestre em Aqüicultura no programa de Pós-Graduação em Aqüicultura da Fundação Universidade Federal do Rio Grande.

Orientador: Prof. Dr. Luís André Sampaio

Co-orientador: Prof. Dr. Kleber Miranda Filho

Rio Grande -RS- Brasil

Janeiro, 2008

ÍNDICE

DEDICATÓRIA	iv
AGRADECIMENTOS	v
1. RESUMO.....	vi
2. ABSTRACT.....	vii
3. INTRODUÇÃO	1
4. OBJETIVO.....	6
5. ARTIGO ANEXO.....	7
6. CONCLUSÕES.....	23
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

“O rio precisa se arriscar e entrar no oceano. E somente quando ele entra no oceano é que o medo desaparece. Porque apenas então o rio saberá que não se trata de desaparecer no oceano, mas tornar-se oceano... Todas as águas vão parar no mar”.
(autor desconhecido)

Dedico este trabalho aos três
amores de minha vida: minha
mãe Vera, meu amor Antero e
ao meu poodle.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe Vera, por toda a dedicação desde sempre em minha vida, apoio, auxílio, amizade e confiança e por acreditar sempre em mim, mais do que eu mesma, e por me amar incondicionalmente.

Ao meu amor Antero. Por sempre estar ao meu lado, me amando e demonstrando carinho e compreensão mesmo nos momentos de mais puro “egoísmo científico” de minha parte, pelas análises de amônia, pelos finais de semana de trabalho...

Ao professor Dr. Luís André Sampaio, pela orientação e paciência, pois sei que não sou nada fácil...

Ao professor Dr. Kleber Miranda Filho, pela co-orientação e auxílio, os quais foram fundamentais para a execução do trabalho proposto.

Ao meu amigo Marlon Porto Severo, pelo auxílio em todas as etapas e procedimentos experimentais do presente estudo. Sem ele teria sido tudo mais difícil...

A todos do laboratório de maricultura da FURG, que direta ou indiretamente me ajudaram, ao grupo de piscicultura marinha e estuarina e ao grupo da carcinocultura.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Aos membros da banca examinadora, prof. Dr. Bernardo Baldisserotto e prof. Dr. Wilson Wasielesky Júnior.

E um agradecimentos especial a aqueles que realmente fizeram parte deste trabalho e tornaram possível esta etapa de minha formação...

...aos pampas.

1. RESUMO

O presente estudo foi conduzido com o objetivo de estimar a toxicidade aguda da amônia (N-NH_3) e do nitrito (N-NO_2^-) para juvenis do pampo *Trachinotus marginatus* ($0,86 \pm 0,21$ g) em diferentes salinidades: 5, 10 e 30‰. Os juvenis foram capturados na Praia do Cassino (Rio Grande, RS), levados para o laboratório e aclimatados nas salinidades desejadas durante 10 dias. Durante este período eles foram alimentados em excesso diariamente. A temperatura e o fotoperíodo foram fixados em 24°C e 12C:12E, a concentração de oxigênio dissolvido e o pH foram medidos diariamente. Grupos de cinco peixes foram expostos a cinco concentrações de amônia (concentrações reais entre 0,28 a 3,53 mg/L N-NH_3) e nitrito (concentrações reais entre 24,8-191,1 mg/L N-NO_2^-) durante 96 h, mais um grupo controle para cada salinidade (três repetições cada). Os testes foram conduzidos em um sistema semi-estático com renovação diária total dos meios experimentais. As concentrações letais medianas e seus respectivos intervalos de confiança (95%) foram estimados com base nos dados de mortalidade registrados nas diferentes concentrações testadas, utilizando o software Trimmed Spearman Karber Method. As CL_{50} - 96 h de amônia foram: 0,66 (0,53-0,81; 5‰), 1,87 (1,65-2,12; 10‰) e 1,06 (0,94-1,20; 30‰) mg/L N-NH_3 . As CL_{50} - 96h para nitrito foram 39,94 (36,39 - 43,84; 5‰), 116,68 (112,52-121,00; 10‰) e 37,55 (20,91-67,44; 30‰) mg/L N-NO_2^- . A toxicidade aguda da amônia e nitrito para o pampo foi afetada pela salinidade. Os resultados do presente estudo mostraram que pampos criados em um ambiente isosmótico são menos sensíveis a N-NH_3 e N-NO_2^- . A tolerância para a amônia é comprometida em salinidades reduzidas, enquanto que a toxicidade do nitrito é similar nas salinidades 5 e 30‰.

Palavras-chave: toxicidade, amônia, nitrito, *Trachinotus marginatus*, pampo, salinidade.

2. ABSTRACT

The present study was conducted to estimate the acute toxicity of ammonia-nitrogen ($\text{NH}_3\text{-N}$) and nitrite-nitrogen ($\text{NO}_2^- \text{-N}$) to juvenile pompano *Trachinotus marginatus* (0.86 ± 0.21 g) at different salinity levels: 5, 10 (equivalent to its isosmotic point), and 30‰. Fish were acclimated to the different salinities for 10 days and fed in excess daily. Groups of five fish (0.86 ± 0.21 g) were exposed to five concentrations of $\text{NH}_3\text{-N}$ and $\text{NO}_2^- \text{-N}$ for 96 h plus control groups for each salinity in three replicates where no toxicant was added, measured concentrations ranged from 0.28 to 3.53 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ and 24.8 to 191.1 mg $\text{NO}_2^- \text{-N/L}$. Tests were run using a standard semi-static system with 100% daily renewal of water and toxicants. The results were based on mortality data registered in different concentrations tested, using the software Trimmed Spearman Karber method. The median-lethal concentrations (LC_{50}) after 96 h of exposure to $\text{NH}_3\text{-N}$ were 0.66 (0.53-0.81), 1.87 (1.65-2.12) and 1.06 (0.94-1.20) mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ for 5‰, 10‰, and 30‰. The LC_{50} -96 h to $\text{NO}_2^- \text{-N}$ were 39.94 (36.39-43.84), 116.68 (112.52-121.00) and 37.55 (20.91-67.44) mg $\text{NO}_2^- \text{-N/L}$ for ‰, 10‰, and 30 ‰. Acute toxicity of $\text{NH}_3\text{-N}$ and $\text{NO}_2^- \text{-N}$ to pompano was affected by salinity. Results of the present study show that pompano reared at an isosmotic environment are less sensitive to $\text{NH}_3\text{-N}$ and $\text{NO}_2^- \text{-N}$. Tolerance to $\text{NH}_3\text{-N}$ is compromised at reduced salinities, while toxicity of $\text{NO}_2^- \text{-N}$ is similar at 5 and 30 ‰.

Keywords: toxicity, ammonia, nitrite, *Trachinotus marginatus*, pompano, salinity

3. INTRODUÇÃO

Na aquicultura, como em qualquer outra atividade econômica, busca-se maximizar a produção e a produtividade, visando sempre à obtenção de lucro. Por conseguinte, os sistemas de criação são direcionados para espécies com maior aceitabilidade comercial. No caso de criações intensivas, busca-se controlar e monitorar totalmente os fatores químicos, físicos, biológicos e nutricionais de modo que sejam proporcionadas as condições para otimizar a produção.

A piscicultura marinha no Brasil tem um alto potencial, tendo em vista as condições climáticas e hidrográficas adequadas em grandes extensões do litoral, além da elevada diversidade de peixes demersais e pelágicos de interesse comercial (Assad & Bursztyn, 2000).

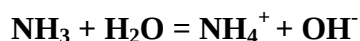
Na maioria dos sistemas de cultivo de peixes carnívoros, os peixes recebem alimento com alto nível de proteína. Parte da proteína ingerida é assimilada pelo animal e convertida em proteína. Por sua vez, o nitrogênio oriundo da proteína não aproveitada pode ser eliminado como nitrogênio orgânico (fezes) ou excretado como amônia (a principal forma de excreção de nitrogênio dos peixes) e/ou uréia (Baldisserotto, 2002).

Uma vez no ambiente aquático, a amônia é oxidada por bactérias nitrificantes e é transformada em nitrito. O nitrito por sua vez, também é oxidado por bactérias nitrificantes e é transformado em nitrato (Oliveira *et al.* 2006). As concentrações de compostos inorgânicos nitrogenados (amônia, nitrito e nitrato) no solo e em águas superficiais estão aumentando em várias regiões do mundo, contribuindo para a degradação de ecossistemas aquáticos marinhos, estuarinos e dulciaquícolas. Consequentemente, os organismos aquáticos sofrem os efeitos tóxicos desse processo de eutrofização (Smith *et al.* 1999; Howarth *et al.* 2000).

Na aquicultura, a amônia pode acumular-se devido à excreção, mineralização de compostos orgânicos através de bactérias heterotróficas (Kamstra *et al.* 1996) e pelo uso de águas eutrofizadas (Bianchini *et al.* 1996). As concentrações de amônia não ionizada (NH_3) e nitrito (NO_2^-) podem atingir níveis tóxicos para os organismos aquáticos cultivados e necessitam de atenção especial quando são utilizadas altas densidades de estocagem (Tomasso, 1994).

Existem valores de tolerância aguda e crônica de N-NH₃ e de N- NO₂⁻ para diversas espécies de peixes dulciaquícolas (Tomasso, 1994; Tucker, 1998; Randall & Tsui, 2002; Tomasso & Grosell, 2005) mas para espécies marinhas, as informações ainda são um tanto limitadas (Wajsbrodt *et al.* 1993; Bianchini *et al.* 1996; Rodrigues *et al.* 2007).

A proporção de amônia (NH₃) e amônio (NH₄⁺) é dependente principalmente: do pH, da temperatura e da salinidade (Jobling, 1994; Hargreaves, 1998; Randall & Tsui, 2002). Quanto maior o pH, maior a proporção de amônia (NH₃), (Randall & Tsui, 2002). A toxicidade da amônia é expressa como amônia total, que consta no somatório da amônia gasosa (NH₃) e do amônio (NH₄⁺). Quando se encontra em solução, apresenta a seguinte reação de equilíbrio (Vinatea, 2004):



No ambiente, a amônia entra no organismo como NH₃ (Randall & Tsui, 2002). E o equilíbrio entre as duas formas é importante para entender os efeitos da amônia nos peixes. O aumento da amônia (NH₃) em águas alcalinas é devido à diminuição da concentração de H⁺, como mostra a reação NH₃ + H⁺ ⇌ NH₄⁺, diminuindo o H⁺, ocorre deslocamento da reação para a esquerda (Baldisserotto, 2002).

A amônia (NH₃) é mais tóxica, uma vez que pode atravessar livremente as membranas celulares por difusão (Randall & Ip, 2006). As membranas biológicas são permeáveis à amônia (NH₃), mas relativamente impermeáveis ao amônio (NH₄⁺) (Randall & Tsui, 2002).

A maioria dos peixes não pode tolerar altas concentrações de amônia ambiental, mas algumas espécies são amônia-tolerantes e têm uma variedade de estratégias para evitar a toxicidade da amônia, seja reduzindo a produção de amônia interna (Randall *et al.* 1999; Ip *et al.* 2004) e /ou convertendo a amônia a outras substâncias menos tóxicas, como a uréia e o glutamato (Peng *et al.* 1998).

Sintomas de intoxicação da amônia como: hiperventilação, natação errática, saltos à superfície, perda de equilíbrio, convulsões e morte já foram relatados por diversos autores (Hillaby & Randall, 1979; Knoph, 1996; Ip *et al.* 2001). Entretanto, a toxicidade da amônia em viveiros de piscicultura é expressa, geralmente, como redução

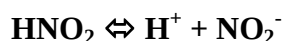
subletal de crescimento dos peixes ou supressão da imunocompetência ao invés de uma toxicidade aguda conduzindo a morte (Hargreaves, 1998). Entretanto a maioria dos estudos realizados com peixes lida com toxicidade da amônia e do nitrito considerando a exposição aguda (Sampaio *et al.* 2002; Weirich & Riche, 2006 a,b).

O nitrito é um produto importante e intermediário na nitrificação bacteriana no ciclo do nitrogênio. Concentrações de nitrito em águas naturais são geralmente baixas, na faixa de micromolar (Svobodová *et al.* 2005).

Atualmente, métodos intensivos de aquicultura têm sido bastante utilizados. Estes sistemas de cultivo incluem a técnica de recirculação de água visando a oxidação da amônia. Porém, se o processo de oxidação for incompleto, grandes quantidades de nitrito poderão ser atingidas no sistema, trazendo prejuízos à atividade (Svobodová *et al.* 2005). A acumulação do nitrito em águas de viveiros pode deteriorar a qualidade da água, reduzindo o crescimento dos organismos cultivados aumentando o consumo de oxigênio, a excreção da amônia e por fim causar elevadas mortalidades (Lin & Chen, 2003).

Em peixes a toxicidade do nitrito é dependente de um grande número de fatores. Estes fatores, assim como para a amônia, estão relacionados à qualidade de água. E ainda, ao tempo de exposição, a espécie de peixe, ao tamanho, a idade e a susceptibilidade do organismo (Jensen, 2003). A toxicidade do nitrito tem sido conhecida como dependente da salinidade da água. A relação entre a toxicidade do nitrito e a concentração de cloretos é linear e tem sido estabelecido que o efeito de cloretos na toxicidade do nitrito é muito significativo (Svobodová *et al.* 2005).

No meio aquoso, o nitrito pode estar sob duas formas: ácido nítrico (HNO_2) e o nitrito ionizado (NO_2^-). O pH determina o equilíbrio entre estas duas formas na água. Em pH bem ácido (2,5) cerca de 90% do total está sob a forma de ácido nítrico. Aumentando o pH eleva-se o percentual de nitrito. Em pH 4,5, 90% está sob a forma de nitrito e acima de pH 5,5 teremos apenas nitrito na água. O ácido nítrico difunde-se livremente nas brânquias, enquanto o nitrito é transportado através da membrana branquial pelo cotransportador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, competindo com os cloretos (Baldisserotto, 2002). A reação de ionização do nitrito se expressa da seguinte forma (Colt & Armstrong, 1981):



O nitrito chega ao sangue dos peixes por difusão e sua toxicidade é devido à oxidação do Fe^{2+} (estado ferroso) funcional da hemoglobina em Fe^{3+} (estado férrico), resultando na formação de metahemoglobina. A metahemoglobina não se liga ao oxigênio, reduzindo assim a capacidade do sangue de transportá-lo. Tal fenômeno pode levar o peixe à morte por asfixia, mesmo havendo oxigênio em abundância na água (Weirich *et al.* 1993; Bianchini *et al.* 1996; Jensen, 2003).

Peixes com grande porcentagem de metahemoglobina sofrem de uma anemia funcional, devido à redução do transporte de oxigênio (Baldiasserotto, 2002). Entretanto, alguns peixes são capazes de tolerar a altos níveis de metahemoglobina no sangue (Kamstra *et al.* 1996).

Descartes antrópicos contendo nitrito têm sido associados à morte de peixes em ecossistemas aquáticos (Philips *et al.* 2002). Entretanto, como é o caso da amônia, concentrações de nitrito causando toxicidade direta têm sido examinadas em estudos de laboratório (Jensen, 2003). Estes estudos têm mostrado que animais marinhos são mais tolerantes a toxicidade do nitrito que animais dulciaquícolas. Provavelmente, devido ao efeito dos íons cloretos (Cl^-) na tolerância de animais aquáticos (Alonso & Camargo, 2003). Uma vez que há competição entre o nitrito e o cloreto pelo mesmo transportador, elevadas concentrações de cloretos tendem a reduzir a toxicidade do nitrito (Baldiasserotto, 2002).

Os peixes da família Carangidae são muito apreciados gastronomicamente e por este motivo, algumas espécies têm sido escolhidas para serem utilizadas na piscicultura (Craig, 2000). O pampo *Trachinotus marginatus* distribui-se ao longo da costa do Atlântico Ocidental desde o Rio de Janeiro (Brasil) até o Uruguai. Exemplares dessa espécie podem atingir até 63 cm de comprimento. Alimentam-se de invertebrados de pequeno porte e habitam águas costeiras e estuarinas (Menezes & Figueiredo, 1980). Os pampos são animais eurialinos, tolerando uma ampla faixa de salinidade, entre 7 e 58‰ (Sampaio *et al.* 2003), mas salinidades mais baixas são toleradas quando a exposição ao ambiente hipoosmótico é gradual.

A salinidade equivalente ao ponto isosmótico de diversas espécies de peixes está na faixa de 10-12‰ (Sampaio & Bianchini, 2002). Acredita-se que quando mantidos

em um ambiente isosmótico, os peixes possam poupar energia para outros processos, pois os custos relacionados à osmorregulação são minimizados. O aumento da salinidade tem sido mostrado como minimizador da ação tóxica da amônia e do nitrito para diversas espécies de peixes (Sampaio *et al.* 2002; Weirich & Riche, 2006 a,b).

A toxicidade aguda da amônia e do nitrito pode variar intra-especificamente ou inter-especificamente (Baldisserotto, 2002; Jensen, 2003). Vários estudos sobre toxicidade da amônia e do nitrito mostram diferenças em relação à tolerância, de acordo com as diferentes condições experimentais a que as espécies estão sendo expostas. Um aumento na salinidade tem mostrado uma melhor tolerância na exposição a N-NH₃ para diversas espécies de peixes marinhos, incluindo o salmão *Oncorhynchus tshawytscha* (Harader & Alen, 1983), a tainha *Mugil platanus* (Sampaio *et al.* 2002), e o linguado *Paralichthys orbignyanus* (Bianchini *et al.* 2006).

As CL₅₀ (96h) para juvenis do robalo europeu *Dicentrarchus labrax*, do pargo *Sparus aurata* e do “turbot” *Psetta maxima* foi de 1,7; 2,5 e 2,6 mg/L N-NH₃ respectivamente, com temperaturas entre 16-18 °C e salinidade em torno de 34‰ (Person-Le Ruyet *et al.* 1995). Tomasso & Grosell (2005) relataram que para juvenis de “spotted seatrout” *Cynoscion nebulosus* a CL₅₀ (96h) foi 1,7 mg/L N-NH₃ em temperatura e salinidade de 26°C e 13‰.

Para juvenis de “black sea bass” *Centropristis striata* expostos ao nitrito em diferentes salinidades (10, 20 e 30‰) a CL₅₀ 24 e 48h foi afetada pela salinidade. Especialmente, os peixes mantidos em salinidade 10‰, mostraram-se menos tolerantes ao nitrito quando comparado aos peixes mantidos nas salinidades 20 e 30‰. No entanto, a CL₅₀ (96h) para amônia foi estimada em 0,46; 0,52 e 0,54 mg/L N-NH₃ nas salinidades 10, 20 e 30‰ respectivamente. Para nitrito a CL₅₀ (96h) foi estimada em 190; 242 e 216 mg/L N-NO₂⁻ na salinidade 10, 20 e 30‰, respectivamente (Weirich & Riche, 2006b). Para o pampo *Trachinotus carolinus* a toxicidade da amônia não foi afetada pela salinidade em 96h de exposição nas salinidades 6, 13 e 25‰.

Como regra geral, a tolerância ao nitrito é comprometida em salinidades reduzidas (Saroglia *et al.* 1981). Para a tainha *M. platanus* a CL₅₀ 96h foi estimada em 1,5; 36,2 e 35,9 mg/L N-NO₂⁻ nas salinidades 0, 15 e 30‰ respectivamente (Sampaio *et al.* 2002). Com o “black sea bass”, a CL₅₀ 96h foi estimada em 190; 242 e 216 mg/L N-NO₂⁻ nas salinidades 10, 20 e 30‰ (Weirich & Riche, 2006b). Maior toxicidade do

nitrito em baixa salinidade também foi encontrada para juvenis do pampo *T. carolinus*, as CL₅₀ 96h foram estimadas em 16, 26 e 34 mg/L N-NO₂⁻ nas salinidades 6, 12 e 25‰ respectivamente por Weirich & Riche (2006a).

A tolerância de larvas do peixe-rei *Odontesthes argentinensis* ao nitrito foi estudada 14 dias após a sua eclosão. A CL₅₀ 96h estimada foi 199 mg/L N-NO₂⁻ em salinidade 35‰ e temperatura de 23°C (Sampaio *et al.* 2006), mostrando ser tolerante a alta concentração de nitrito.

Sobre a relação dos cloretos com a toxicidade do nitrito, Kamstra *et al* (1996) relataram que o nitrito age como um inibidor competitivo da atividade de cloretos nas brânquias da truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*. Este fenômeno oferece uma explicação para o efeito protetor do cloreto ambiental contra a toxicidade do nitrito.

No entanto, uma série de pré-requisitos deve ser preenchida pela espécie que tenciona-se manter em cativeiro, avaliando suas características biológicas, a temperatura, a salinidade, sua exigência nutricional e a estrutura adequada para seu cultivo. A tolerância aos compostos nitrogenados, representados pela amônia, nitrito e nitrato, também são importantes. Dos três compostos citados, a amônia e nitrito têm sido os mais estudados e destacam-se pela sua toxicidade mesmo em concentrações baixas, o que não ocorre com o nitrato, que somente é tóxico em concentrações muito elevadas.

4. OBJETIVO

Avaliar o efeito da salinidade sobre a tolerância de juvenis do pampo-malhado *Trachinotus marginatus* frente à exposição aguda a amônia e ao nitrito em testes semi-estáticos de toxicidade.

5. ARTIGO ANEXO

Tolerance of juvenile pompano *Trachinotus marginatus* to acute ammonia and nitrite exposure at different salinity levels

Luiza Dy F. Costa, Kleber C. Miranda-Filho, Marlon P. Severo, Luis A. Sampaio^{*}.

Artigo submetido para a revista AQUACULTURE.

Tolerance of juvenile pompano *Trachinotus marginatus* to acute ammonia and nitrite exposure at different salinity levels

Luiza Dy F. Costa, Kleber C. Miranda-Filho, Marlon P. Severo, Luis A. Sampaio*.

Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Depto de Oceanografia, Laboratório de Maricultura, Rio Grande-RS, CP 474, Brasil, CEP 96201-900, Brasil.

+ 55 53 32368131; +55 53 32368042*

*Corresponding author: sampaio@mikrus.com.br

Abstract

The present study was conducted to estimate the acute toxicity of ammonia-nitrogen ($\text{NH}_3\text{-N}$) and nitrite-nitrogen ($\text{NO}_2\text{-N}$) to juvenile pompano *Trachinotus marginatus* (0.86 ± 0.21 g) at different salinity levels: 5, 10 (equivalent to its isosmotic point), and 30‰. Fish were acclimated to the different salinities during 10 days and fed *ad libitum* daily. Groups of five fishes (0.86 ± 0.21 g) were exposed to five concentrations of $\text{NH}_3\text{-N}$ and $\text{NO}_2\text{-N}$ for 96 h plus control groups for each salinity where no toxicant was added, measured concentrations ranged from 0.28 to 3.53 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ and 24.8 to 191.1 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$. Tests were run using a standard semi-static system with 100% daily renewal of water and toxicants. The results were based on mortality data registered in different concentrations tested, using the software Trimmed Spearman Karber method. The median-lethal concentrations (LC_{50}) after 96 h of exposure to $\text{NH}_3\text{-N}$ were 0.66 (0.53-0.81), 1.87 (1.65-2.12) and 1.06 (0.94-1.20) mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ for 5, 10, and 30 ‰. The LC_{50} -96 h to $\text{NO}_2\text{-N}$ were 39.94 (36.39-43.84), 116.68 (112.52-121.00) and 37.55 (20.91-67.44) mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ for 5, 10, and 30 ‰. Acute toxicity of $\text{NH}_3\text{-N}$ and $\text{NO}_2\text{-N}$ to pompano was affected by salinity. Results of the present study show that pompano reared at an isosmotic environment are less sensitive to $\text{NH}_3\text{-N}$ and $\text{NO}_2\text{-N}$. Resistance to $\text{NH}_3\text{-N}$ is compromised at reduced salinities, while toxicity of $\text{NO}_2\text{-N}$ is similar at 5 and 30 ‰.

Keywords: toxicity; ammonia; nitrite; *Trachinotus marginatus*; pompano; salinity

1. Introduction

Carangidae are highly prized fish and are being considered for aquaculture (Craig, 2000). The pompano *Trachinotus marginatus* is found in estuaries and coastal waters along the Western Atlantic Coast, from Rio de Janeiro (Brazil) to Uruguay (Menezes and Figueiredo, 1980). Pompano are euryhaline, they tolerate a wide range of salinity, between 7 and 58 ‰, after acute exposure of individuals acclimated to seawater (35 ‰) (Sampaio et al., 2003), but after gradual exposure to diluted seawater, pompano can face even lower salinities.

The protein requirement of carnivorous fish is high, which is likely to result in elevated ammonia excretion levels (Carter et al., 1998). The buildup of ammonia also leads to an increase on nitrite concentration, through mineralization of organic compounds by heterotrophic bacteria (Kamstra et al., 1996).

Both unionized ammonia-nitrogen ($\text{NH}_3\text{-N}$) and nitrite-nitrogen ($\text{NO}_2\text{-N}$) can reach toxic levels for cultured fish, and especial attention is needed when high stocking densities are employed. Acute and chronic toxicity of $\text{NH}_3\text{-N}$ and $\text{NO}_2\text{-N}$ have been determined for a number of freshwater finfish species (Lewis and Morris, 1986; Tomasso, 1994; Randall and Tsui, 2002; Tomasso and Grosell, 2005). However, only limited information currently exists with respect to marine species (Wajsbrot et al., 1993; Bianchini et al., 1996; Rodrigues et al., 2007), including Florida pompano *Trachinotus carolinus* (Weirich and Riche, 2006).

The salinity equivalent to the isosmotic point of several fish species ranges from 10 to 12 ‰ (Sampaio and Bianchini, 2002). It is believed that when exposed to their isosmotic point, fish can spare energy for other processes, because the costs related to osmoregulation are minimized. Increasing salinity has been shown to minimize the

toxic action of $\text{NH}_3\text{-N}$ and $\text{NO}_2\text{-N}$ for several species (Sampaio et al., 2002; Weirich and Riche, 2006a, b). The purpose of the present study was to evaluate the acute tolerance of juvenile pompano to ammonia and nitrite exposed to three environmental salinities, including one equivalent to the isosmotic point, plus higher and lower salinity levels.

2. Material and Methods

Juvenile pompano were captured during the summer along the surf zone at Cassino Beach, Rio Grande/RS, Southern Brazil ($32^\circ 12' \text{ S}$, $52^\circ 10' \text{ W}$) and transported to the Laboratory of Mariculture of the Federal University of Rio Grande (FURG). They were acclimated during two weeks in one 1,000 L tank filled with seawater, with salinity similar to the collection site (30-35 ‰), in a flow-through system. They were then divided in three groups and transferred to 200 L tanks, where salinity was reduced gradually (5 ‰/day) to 5, 10 and 30 ‰ with dechlorinated tap water. Juvenile pompano were acclimated to the desired salinities during 10 days, in this period water was renewed 100%/day in the morning and it was constantly aerated. Photoperiod and temperature were fixed at 12L:12D and 24°C , respectively. Fishes were fed *ad libitum* with a commercial diet (INVE, 48% crude protein).

Experiments were conducted using 4 L plastic tanks filled with 2.5 L of water of the desired salinity, using a standard semi-static system. Temperature was set at $24 \pm 2^\circ\text{C}$ in a water bath, and water was continuously aerated. Water and test solutions were fully exchanged daily, and food was withheld during the trials. Groups of 5 fishes ($0.86 \pm 0.21 \text{ g}$) were exposed to five concentrations of $\text{NH}_3\text{-N}$ and $\text{NO}_2\text{-N}$ for 96 h plus control groups for each salinity where no toxicant was added, measured concentrations

ranged from 0.28 to 3.53 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ and 24.8 to 191.1 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$. Tests solutions were prepared with reagent grade ammonium chloride and sodium nitrite (Synth, Brazil). All tests were run in triplicate. Mortality was registered every 24 h, fish were considered dead if they remained immobile after a mechanical stimuli.

Alkalinity, calcium and chloride concentration were determined before each toxicity trial, three samples of water at each salinity were analysed. Water samples from each replicate tank were collected daily during the trials to measure temperature, salinity, pH, dissolved oxygen, $\text{NH}_3\text{-N}$, and $\text{NO}_2\text{-N}$ levels.

Calcium concentration was determined using a flame photometer (Micronal, Brazil), while a commercial kit (Doles Ltda., Brazil) was used to analyze chloride concentration on a spectrophotometer, samples were read in micro plate (Bio-Tek Elx-800, USA). Alkalinity was determined by titration (APHA, 1989). Calcium, chloride and alkalinity levels are presented in Table 1. Temperature and dissolved oxygen were measured with a YSI Model 55 meter (Yellow Springs Instruments, USA) and pH with a Hanna model HI223 pHmeter. Salinity was measured with a hand refractometer (Atago, Japan). Table 2 presents water quality parameters measured daily during the test.

Total $\text{NH}_3\text{-N}$ concentrations were determined using specific ammonia electrode (Thermo Electron Co. Beverly, USA) connected to a pHmeter (Hanna, model HI223, USA) in high pH condition (> 12) using ISA solution. $\text{NH}_3\text{-N}$ concentrations were calculated using the equations of Ostrensky et al. (1991) adapted from Whitfield (1974) and Bower and Bidwell (1978) according to the values of pH, temperature and salinity measured during the experiment. $\text{NO}_2\text{-N}$ concentrations were determined with spectrophotometer using the method described by Aminot and Chaussepied (1983).

Cumulative mortality data were used to estimate median lethal concentration (LC_{50}) and their respective confidence intervals (95%) for NH_3 -N and NO_2 -N at each salinity level, using the software Trimmed Spearman Karber method (Hamilton et al., 1977). Safe levels were calculated after Sprague (1971), using an application factor of 0.1. Comparisons among median toxic concentrations for NH_3 -N and NO_2 -N at each salinity level were made by one-way ANOVA followed by the Test of Tukey with significance level of 95%, using the software Statistica 6.0.

3. Results and Discussion

Median lethal concentrations of NH_3 -N and NO_2 -N to juvenile pompano at 5, 10 and 30 ‰ were estimated only after 96 h, because within the range of concentrations of NH_3 -N and NO_2 -N tested, it was not observed mortalities above 50% after 24, 48 and 72 h of exposure to these toxicants. Despite not allowing LC_{50} estimates before 96 h, results of the present experiments demonstrate that toxicity of both nitrogenous compounds increase over time. The same pattern was observed for Florida pompano exposed to NO_2 -N, but not when exposed to NH_3 -N, because LC_{50-24h} is similar to LC_{50-96h} (Weirich and Riche, 2006a).

LC_{50-96h} for NH_3 -N and NO_2 -N to juvenile pompano were influenced by experimental environmental salinity (Table 3). They are more sensitive ($P<0.05$) to NH_3 -N when exposed in low salinity water compared to higher environmental salinities, as it was previously observed for Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Harader and Allen, 1983) and grey mullet (Sampaio et al., 2002). However, there was also a significant difference ($P<0.05$) when comparing pompano acclimated to an isosmotic environment or in full seawater, the isosmotic condition was found to be safer. This

result was not observed for other species, including sunshine bass (Weirich, 1983), grey mullet (Sampaio et al., 2002), and Florida pompano (Weirich and Riche, 2006a).

When considering $\text{NO}_2\text{-N}$, the present results do not follow the same pattern observed for other species, since toxicity to pompano is similar at 5 ‰ and at 30 ‰, but as it was observed for $\text{NH}_3\text{-N}$, there is an increased tolerance when they are kept at an isosmotic condition. As a general rule, tolerance to $\text{NO}_2\text{-N}$ is compromised at reduced salinities (Saroglia et al., 1981; Sampaio et al., 2002; Weirich and Riche, 2006b), however Weirich and Riche (2006a) did not find a significant effect of salinity on the toxicity of $\text{NO}_2\text{-N}$ to Florida pompano after 96 h of exposure.

The mechanisms explaining the beneficial effects of increasing salinity on toxicity of $\text{NH}_3\text{-N}$ are thought to be due to increased sodium and calcium levels, which have been shown to facilitate ammonia excretion via NH_4^+ and Na^+ exchange at the gill membrane and to prevent the influx of $\text{NH}_3\text{-N}$ by decreasing membrane permeability (Soderberg and Meade, 1992). Regarding $\text{NO}_2\text{-N}$, the higher concentration of chloride ions in saline waters hampers the branchial influx of $\text{NO}_2\text{-N}$, thus reducing its toxicity (Tomasso, 1994). However, it is important to observe a possible role of increased tolerance to the toxicity of nitrogenous compounds when fish are exposed to them in an isosmotic environment. The energy sparing effect of an isosmotic condition between blood plasma and the environment may be responsible for the increased LC_{50} observed for juvenile pompano.

It is difficult to compare tolerance among species because it is dependent on the environmental conditions the trials were run (temperature, pH) and also on biological characteristics (weight, age, nutritional condition). However, toxicity of $\text{NH}_3\text{-N}$ for estuarine and marine fish ranges from 0.84 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ to grey mullet (Sampaio et al.,

2002) to 2.7 mg NH₃-N/L to gilthead seabream (Person-Le Ruyet et al., 1995).

Regarding NO₂-N, there is a wider range of results, including sensitive species on the range of 31 mg NO₂-N/L to grey mullet (Sampaio et al., 2002) and 36 mg NO₂-N/L to Brazilian flounder (Bianchini et al., 1996), and less sensitive ones on the range of 274 to 974 mg mg NO₂-N/L to seabass and European eel respectively (Saroglia et al, 1981). Therefore, pompano may be considered relatively sensitive to both nitrogenous compounds when reared at an isosmotic condition, but when kept in full strength sea water pompano is closer to the more sensitive group of species.

In summary, results of the present study show that pompano reared at an isosmotic environment are more tolerant to NH₃-N and NO₂-N. Resistance to NH₃-N is compromised at reduced salinities, while toxicity of NO₂-N is similar at 5 and 30 ‰.

Acknowledgements

L.D.F. Costa is a student of the Graduate Program in Aquaculture at FURG and is supported by CAPES. L.A. Sampaio is a research fellow of Brazilian CNPq (Process 301673/2006-3). We wish to thank Cristina Vaz Avelar de Carvalho and Dr. Adalto Bianchini for their assistance.

References

- American Public Health Association (APHA)., 1989. Standard methods for examination of water and wastewater. Washington. 1193pp.
- Aminot, A., Chaussepied, M., 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu marin. Brest. Cnexo. 395 pp.
- Bianchini, A., Wasielesky, W., Miranda-Filho, K.C., 1996. Toxicity of nitrogenous compounds to juveniles of flatfish *Paralichthys orbignyanus*. Bull. Environ. Contam.Toxicol. 56, 453-459.
- Bower, C.E., Bidwell, J., 1978. Ionization of ammonia in seawater; effects of temperature, pH, and salinity. J. Fish Res. Board Canada 35, 1012-1016.
- Carter, C.G., Houliban, D.F., Owen, S.F., 1998. Protein synthesis, nitrogen excretion and long –term growth of juvenile *Pleuronectes flesus*. J. Fish. Biol. 5, 272-284.
- Craig, S.R., 2002. Pompano Culture In: Encyclopedia of aquaculture (ed. by R.R. Stickney) 660-663 pp. John Wiley & Sons, New York, NY, USA.
- 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.
- Harader, R.R. Jr., Allen, G.H., 1983. Ammonia toxicity to chinook salmon parr: reduction in saline water. Trans. Am. Fish. Soc. 112, 834–837.
- Kamstra, A., Span, J.A., Weerd, J.H., 1996. The acute toxicity and sublethal effects of nitrite on growth and feed utilization of European eel, *Anguilla Anguilla* (L.). Aquacult. Res. 27, 903-911.
- Lewis, W.M ., Morris., D.P., 1986. Toxicity of nitrite to fish: a review. Trans. Amer. Fish. Soc. 115,183-195.

- Menezes, N.A., Figueiredo, J.L., 1980. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. IV. Teleostei (3). São Paulo, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. 96 pp.
- 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. Ci. 64(4), 383-389.
- Person-Le, R.J., Chartois, H., Desbruyerees, E., Thomas, J.L., 1994. Ammonia acute toxicity in turbot (*Scophthalmus maximus*) juveniles. Euro. Aquacult. Soc. Spec. Public.22, 283-291.
- Randall, D.J., Tsui, T.K.N., 2002. Ammonia toxicity in fish. Mar. Pollut. Bull. 45, 17-23.
- 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.
- Sampaio, L. A., Wasielesky, W., Miranda-Filho, K.C., 2002. Effect of salinity on acute toxicity of ammonia and nitrite to juvenile *Mugil platanus*. Bull. Environ. Contam. Tox. 68, 668– 674.
- Saroglia, M.G., Scarano, G., Tibladi, E., 1981. Acute toxicity of nitrite to sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and european eel (*Anguilla anguilla*). J. World. Maricul.Soc. 12, 121-126.
- Soderberg, R.W., Meade JW., 1992. Effects of sodium and calcium on acute toxicity of un-ionized ammonia to Atlantic salmon and lake trout. J. Appl. Aquacult. 1, 83–92.

- Sprague, J.B., 1971. Measurement of pollutant toxicity to fish - III. Sublethal effects and "safe" concentrations. *Water Res.* 5, 245-266.
- Tomasso, J.R., 1994. Toxicity of nitrogenous wastes to aquaculture animals. *Rev. Fish. Sci.* 2, 291–314.
- Tomasso J.R., Grosell M., 2005. Physiological basis for large differences in resistance to nitrite among freshwater and freshwater acclimated euryhaline fishes. *Environ. Sci. Technol.* 39, 98–102.
- Weirich, C.R., Riche, M., 2006a. Acute tolerance of juvenile Florida pompano, *Trachinotus carolinus* L., to ammonia and nitrite at various salinities. *Aquac. Res.* 37, 855-861.
- Weirich, C.R., Riche, M., 2006b. Tolerance of juvenile black sea bass *Centropristis striata* to acute ammonia and nitrite exposure at various salinities. *Fish. Scien.* 72, 915-921.
- Whitfield, M., 1974. The hydrolysis of ammonium ions in sea water – a theoretical study. *J. Mar. Biol.* 54, 565-580.

Table 1 - Calcium, chloride and alkalinity (mean $\pm$ SE, n = 3) measured before exposure of juvenile pompano *Trachinotus marginatus* to ammonia (NH₃-N) and nitrite (NO₂-N) at different salinity levels.

Parameter	Salinity (‰)		
	5	10	30
Calcium (mEq L ⁻¹)	1.80 $\pm$ 0.12	139.0 $\pm$ 1.83	40.8 $\pm$ 0.8
Chloride (mEq L ⁻¹)	3.33 $\pm$ 0.07	231.14 $\pm$ 12.5	69.4 $\pm$ 1.1
Alkalinity (mg L ⁻¹ as CaCO ₃)	11.9 $\pm$ 1.3	496.1 $\pm$ 6.0	141.6 $\pm$ 3.2

Table 2 - Water quality parameters (mean $\pm$ SE, n=8) measured during 96 h of exposure of juvenile pompano *Trachinotus marginatus* to ammonia (NH₃-N) and nitrite (NO₂-N) at different salinity levels.

Toxicant	Salinity (‰)	Temperature (°C)	DO* (mg/L)	pH
NH ₃ -N	30.1 $\pm$ 0.2	24.3 $\pm$ 0.9	7.6 $\pm$ 1.2	8.1 $\pm$ 0.1
	10.0 $\pm$ 0.1	24.2 $\pm$ 0.8	8.2 $\pm$ 0.3	7.3 $\pm$ 0.1
	5.1 $\pm$ 0.1	24.3 $\pm$ 1.0	7.2 $\pm$ 0.4	7.7 $\pm$ 0.1
NO ₂ -N	30.1 $\pm$ 0.2	24.5 $\pm$ 1.1	6.9 $\pm$ 0.4	8.1 $\pm$ 0.1
	10.0 $\pm$ 0.1	24.5 $\pm$ 0.7	7.5 $\pm$ 0.6	7.8 $\pm$ 0.2
	5.1 $\pm$ 0.1	23.6 $\pm$ 1.2	7.6 $\pm$ 0.5	7.4 $\pm$ 0.4

*Dissolved oxygen.

Table 3 - Median lethal concentrations (LC₅₀ – 96 h) and the respective confidence interval and safe levels for ammonia (mg NH₃-N/L) and nitrite (mg NO₂-N/L) to juvenile pompano *Trachinotus marginatus* in different salinities (5, 10, and 30‰).

Salinity	NH ₃ -N		NO ₂ -N	
	LC ₅₀	Safe level	LC ₅₀	Safe level
5	0.66 (0.53-0.81) ^a	0.066	39.94 (36.39-43.84) ^a	3.99
10	1.87 (1.65-2.12) ^c	0.187	116.68 (112.52-121.00) ^b	11.67
30	1.06 (0.94-1.20) ^b	0.106	37.55 (20.91-67.44) ^a	3.75

Different letters at each column indicate significant difference (P<0.05) after one-way ANOVA followed by the Test of Tukey.

6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo indicam que juvenis de pampo *Trachinotus marginatus* são relativamente sensíveis a ambos compostos nitrogenados, tanto amônia como para nitrito. A espécie mostra-se tão sensível à amônia como outras espécies nas mesmas condições de temperatura e salinidade.

A salinidade influenciou na toxicidade de amônia e de nitrito para o pampo *T. marginatus*. Os pampos quando expostos em condições isosmóticas, salinidade 10‰, demonstraram uma maior tolerância tanto para amônia como para nitrito. A toxicidade da amônia é maior na salinidade 5‰ do que na salinidade 30‰, porém o efeito da toxicidade do nitrito é similar nas salinidades 5 e 30‰.

Comparativamente com outras espécies de peixes o pampo *T. marginatus* mostra-se mais sensível à amônia quando exposto em salinidades baixas. Em níveis isosmóticos a tendência é de uma maior tolerância para ambos compostos nitrogenados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO A & JA CAMARGO. 2003. Short-term toxicity of ammonia, nitrite, and nitrate to the aquatic snail *Potamopyrgus antipodarum* (Hydrobiidae, Mollusca). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 70: 1006-1012.
- VINATEA, LA 2004. Princípios químicos da qualidade da água em aquicultura. Uma revisão para peixes e camarões. Editora UFSC. 231p.
- ASSAD, TL & M BURSZTYN. 2000. Aquicultura Sustentável. In: Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável. Editado por Valenti, W.C; Poli, C.R; Pereira, J.A & Borghetti, J.R. Brasília: CNPq. Ministério da Ciência e Tecnologia. 399p.
- BALDISSEROTTO, B. 2002. Fisiologia de peixes aplicada à aquicultura. Editora UFSM, Santa Maria, 212p.
- BIANCHINI, A, W WASIELESKY & KC MIRANDA-FILHO. 1996. Toxicity of nitrogenous compounds to juveniles of flatfish *Paralichthys orbignyanus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 56: 453-459.
- COLT, J & D ARMSTRONG. 1981. Nitrogen toxicity to crustaceans, fish and mollusc. In: Proceedings of the bioengineering symposium for fish culture. Allen, L; Kinney, E. (Ed.). Fish Culture Section of the American Fisheries Society, Bethesda, EUA. p. 34-47.
- CRAIG, SR. 2002. Pompano Culture. In: Encyclopedia of aquaculture (ed. by R.R. Stickney) John Wiley & Sons, Nova Iorque, EUA, p. 660-663.
- HARADER, RR JR & GH ALLEN. 1983. Ammonia toxicity to chinook salmon parr: reduction in saline water. *Trans. Am. Fish. Soc.* 112: 834-837.
- HARGREAVES, JA. 1998. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. *Aquaculture.*, 166: 181-212.
- HILLABY, BA & DJ RANDALL. 1979. Acute ammonia toxicity and ammonia excretion in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Board Can.*, 36: 621-629.
- HOWARTH, RW, D ANDERSON, J CLOERN, C ELFRING, C HOPKINSON & B LAPOINTE. 2000. Nutrient pollution of coastal rivers, bays, and seas. *Iss. Ecol.*, 7: 1-15.

- IP, YK, SF CHEW, JM WILSON & DJ RANDALL. 2004. Defenses against ammonia toxicity in tropical fishes exposed to high concentration of environmental ammonia: a review. *J.Comp. Physiol. B.* 174: 565-575.
- IP, YK, SF CHEW & DJ RANDALL. 2001. Ammonia toxicity, tolerance and excretion. In: Wright, P.A., Anderson, P.M. (Eds.), Nitrogen Excretion. New York, Academic Press Inc., New York, 109-148 p.
- JENSEN FB. 2003. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comp. Biochem. Physiol., Part A*, 135: 9-24.
- JOBLING, M 1994. Pollutants and toxic chemicals In: Fish Bioenergetics. Fish and Fisheries Series 13. Chapman & Hall, Londres, UK, 308p.
- KAMSTRA, A, JA SPAN & JH WEERD. 1996. The acute toxicity and sublethal effects of nitrite on growth and feed utilization of European eel, *Anguilla Anguilla* (L.). *Aquacult. Res.*, 27: 903-911.
- KNOPH, MB. 1996. Gill ventilation frequency and mortality of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) exposed to high ammonia levels in seawater. *Water Res.*, 30: 837-842.
- LIN, Y-C & J-C CHEN. 2003. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. *Aquaculture*, 224:193-201.
- MENEZES, NA & JL FIGUIREDO. 1980. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. IV. Teleostei (3). São Paulo, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. 96p.
- OLIVEIRA, SS, W JR WASIELESKY, ELC BALLESTER & PC ABREU. 2006. Caracterização da assembléia de bactérias nitrificantes pelo método “Fluorescente *in situ* Hybridization” (FISH) no biofilme e água de larvicultura do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*. *Atlântica*, 28: 33-45.
- PENG, KW, SF CHEW, CB LIM, SSL KUAH, WK KOK & YK IP. 1998. The mudskippers *Periophthalmodon schlosseri* and *Boleophthalmus boddarti* can tolerate environmental NH₃ concentrations of 446 and 36l M, respectively. *Fish Physiol. Biochem.*, 19: 59-69.
- PERSON-LE RUYET, J, H CHARTOIS, L QUEMENER.1995. Comparative acute ammonia toxicity in marine fish and plasma ammonia response. *Aquaculture.*, 136:181-194.

- PHILIPS S, HJ LAANBROEK & W VERSTRAETE. 2002. Origin, causes and effects of increased nitrite concentrations in aquatic environments. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, 1:115-141.
- RANDALL, DJ & YK IP. 2006. Ammonia as respiratory gas in water an air breathing fishes. *Resp. Physiol. Neurob.*, 154: 216-225.
- RANDALL, DJ & TKN TSUI. 2002. Ammonia toxicity in fish. *Mar Pollut Bull.*, 45:17-23.
- RANDALL, DJ, JM WILSON, KW PENG, TWK KOK, SSL KUAH, SF CHEW, TJ LAM & YK IP. 1999. The mudskipper, *Periophthalmodon schlosseri*, actively transports NH_4^+ against a concentration gradient. *Am. J. Physiol.*, 46: R1562-R1567.
- RODRIGUES, RV, MH SCHWARZ, BC DELBOS & LA SAMPAIO. 2007. Acute toxicity and sublethal effects of ammonia and nitrite for juvenile cobia *Rachycentron canadum*. *Aquaculture*, 271: 553-557.
- SAMPAIO, LA, TL PISSETI & M MORENA. 2006. Toxicidade aguda do nitrito em larvas do peixe-rei marinho *Odontesthes argentinensis* (Teleostei, Atherinopsidae). *Ciência Rural*, 36: 1008-1010.
- SAMPAIO, LA, MB TESSER & D BURKERT. 2003. Tolerância de juvenis do pampo *Trachinotus marginatus* (Teleostei, Carangidae) ao choque agudo de salinidade em laboratório. *Ciência Rural*, 33:757-761.
- SAMPAIO, L.A & A BIANCHINI. 2002. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. *J. Exp. Mar.Biol. Ecol.*, 269: 187-196.
- SAMPAIO, LA, W WASIELESKY & KC MIRANDA-FILHO. 2002. Effect of salinity on acute toxicity of ammonia and nitrite to juvenile *Mugil platanus*. *Bull. Environ. Contam. Tox.*, 68: 668- 674.
- SAROGLIA, M.G., G SCARANO & E TIBLADI. 1981. Acute toxicity of nitrite to sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and european eel (*Anguilla anguilla*). *J. World. Maricul. Soc.* 12: 121-126.
- SMITH, VH, GD TILMAN & JC NEKOLA. 1999. Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environ Pollut.*, 100:179-196.

- SVOBODOVÁ, Z, M JANA, D JANA, G LADISLAV, L VERA, P GORZYSLAW, V JOSEF & K HANA. 2005. Haematological and biochemical profiles of carp blood following nitrite exposure at different concentrations of chloride. *Aquac. Res.*, 36: 1177-1184.
- TOMASSO, JR. 1994. Toxicity of nitrogenous wastes to aquaculture animals. *Rev. Fish. Sci.*, 2: 291-314.
- TOMASSO, JR & M GROSELL. 2005. Physiological basis for large differences in resistance to nitrite among freshwater and freshwater acclimated euryhaline fishes. *Environ. Sci. Technol.*, 39: 98–102.
- TUCKER, JW JR. *Marine Fish Culture*. 1998. Kluwer Academic Publishers, Boston, EUA. 76p.
- WAJSBROT, N, A GASITH, A DIAMANT & DM POPER. 1993. Chronic toxicity of ammonia to juvenile seabream *Sparus aurata* and related histopathological effects. *J. Fish. Biol.*, 42: 321-328.
- WEIRICH, CR, JR TOMASSO & TJI SMITH. 1993. Toxicity of ammonia and nitrite to sunshine bass in selected environments. *J Aquat. Health.*, 5: 64-72.
- WEIRICH, CR & M RICHE. 2006a. Acute tolerance of juvenile Florida Pompano, *Trachinotus carolinus* L., to ammonia and nitrite at various salinities. *Aquac. Res.*, 37: 855-861.
- WEIRICH, CR & M RICHE. 2006b. Tolerance of juvenile black sea bass *Centropristis striata* to acute ammonia and nitrite exposure at various salinities. *Fish. Scien.*, 72: 915-921.