

TOXICIDADE DO NITRITO PARA O CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* CULTIVADO EM SISTEMAS DE ÁGUA CLARA E BIOFLOCOS

Fabiana Penalva de MELO¹; Maria Gabriela Padilha FERREIRA¹; Ítalo Felipe Mascena BRAGA¹; Eudes de Souza CORREIA¹

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade do nitrito sobre o crescimento, sobrevivência e quantidade de hemócitos totais na hemolinfa de juvenis do camarão *Litopenaeus vannamei* (1,60±0,06 g) submetidos a diferentes concentrações de N-nitrito e dois sistemas de cultivo. Os camarões foram distribuídos em 24 unidades experimentais (área de 0,20 m² e volume útil de 30 L), numa densidade de 75 camarões m⁻², em um delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2, com quatro concentrações de N-nitrito (0-Controle, 10, 20 e 40 mg N-NO₂ L⁻¹) e dois sistemas de cultivo (água clara e bioflocos). Os juvenis de *L. vannamei* foram alimentados com ração comercial (35% proteína bruta). As concentrações de N-NO₂ influenciaram significativamente (P<0,05) o peso final (1,71 a 3,36 g), a sobrevivência (40,7 a 96,3 %) e a taxa de crescimento específico (0,15 a 2,42% dia⁻¹). A interação entre as concentrações de N-nitrito e os sistemas de cultivo não influenciaram significativamente (P≥0,05) a quantidade total de hemócitos. Desta forma, é possível cultivar o camarão *L. vannamei* em concentrações de até 20 mg N-NO₂ L⁻¹ por um período de 30 dias sem comprometer o crescimento e a sobrevivência.

Palavras-chave: toxicidade subcrônica; hemócito total; crescimento; sobrevivência; hemolinfa

TOXICITY OF NITRITE ON SHRIMP *Litopenaeus vannamei* REARED IN CLEAR WATER AND BIOFLOC SYSTEMS

ABSTRACT

This work aimed to evaluate the toxicity of N-nitrite on growth, survival and the amount of total hemocytes in the hemolymph of the shrimp juveniles *Litopenaeus vannamei* (1.60±0.06 g) reared in different concentrations of N-nitrite and two culture systems. The shrimps were distributed into 24 experimental units (area of 0.20 m² and useful volume of 30 L) at a density of 75 shrimp m⁻² in a completely randomized design with 2x2 factorial scheme, using four nitrite-N concentrations (0-Control, 10, 20 and 40 mg NO₂-N L⁻¹) and two culture systems (clear water and biofloc). Juveniles of *L. vannamei* were fed with commercial feed (35% crude protein). The NO₂-N concentrations influenced significantly (P<0.05) body weight (1.71 to 3.36 g), survival (40.7 to 96.3%) and specific growth rate (0.15 to 2.42% day⁻¹). The interaction between the N-nitrite concentrations and culture systems did not affect significantly (P≥0.05) the total amount of hemocytes. Thus, it is possible to culture the *L. vannamei* shrimp at concentrations of 10 and 20 mg N-NO₂ L⁻¹ for a period of 30 days without compromising growth and survival.

Key words: toxicity subchronic; total hemocyte; growth; survival; hemolymph

Artigo Científico: Recebido em 09/03/2016 – Aprovado em 20/10/2016

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Pesca e Aquicultura, Laboratório de Sistemas de Produção Aquícola (LAPAQ), 52171-900, Recife, PE, Brasil.

INTRODUÇÃO

O acúmulo de substâncias tóxicas inorgânicas, como amônia e nitrito, é um dos principais problemas de qualidade da água em sistemas aquícolas intensivos (COLT e ARMSTRONG, 1981; TIMMONS e EBELING, 2010; BARBIERI *et al.*, 2014). O nitrito é um importante produto intermediário no processo de nitrificação ou desnitrificação do nitrato no ciclo do nitrogênio (JENSEN, 2003; KROUPOVA *et al.*, 2005). Dependendo das concentrações e do estágio de desenvolvimento do organismo aquático cultivado, pode vir a ser bastante tóxico, causando mortalidade em larviculturas e sistemas de cultivo (BROWNELL, 1980; BARBIERI, 2010).

Entre os principais efeitos tóxicos do nitrito, destacam-se aqueles que têm relação direta com o transporte de oxigênio, a oxidação de importantes compostos e a possibilidade de ocasionar danos aos tecidos (FRIAS-ESPERICUETA e PAÉZ-OSUNA, 2001). O mecanismo tóxico do nitrito atua sobre o transporte de oxigênio, no qual o nitrito se liga à hemocianina, ocupando o lugar do oxigênio, transformando-a em metahemocianina, a qual é incapaz de transferir oxigênio para os tecidos. Dessa forma, ocorre uma redução na quantidade de oxigênio disponível para o metabolismo (TAHON *et al.*, 1988), podendo ocorrer hipóxia e, conseqüentemente, morte dos organismos cultivados (CHEN *et al.*, 1986).

A tecnologia de bioflocos (BFT - *Biofloc Technology*) se apresenta como uma alternativa para resolver problemas nutricionais e de biossegurança, uma vez que esse sistema tem como base a manipulação da comunidade microbiana, através da adição de fontes de carbono que promovem o crescimento de bactérias heterotróficas (CRAB *et al.*, 2007; CRAB *et al.*, 2009). O desenvolvimento das bactérias heterotróficas em cultivos intensivos e semi-intensivos resultam na conversão de compostos nitrogenados inorgânicos em células microbianas ricas em proteína (ASADUZZAMAN *et al.*, 2008). O nitrogênio inorgânico é absorvido e degradado pelas bactérias quando os substratos orgânicos têm uma alta relação C/N (AZIM *et al.*, 2008; CHAMBERLAIN *et al.*, 2001).

Em sistemas de cultivo com tecnologia de bioflocos (BFT), as bactérias heterotróficas e as

bactérias autotróficas nitrificantes possuem maior eficiência na remoção do nitrogênio da amônia (EBELING *et al.*, 2006; HARGREAVES, 2006). Entretanto, pode ocorrer aumento nas concentrações de amônia, caso as bactérias quimioautotróficas não estejam presentes na fase inicial do cultivo, havendo uma tendência de acúmulo inicial desse composto. Além disso, se a via autotrófica chegar a dominar o sistema, a amônia pode ser oxidada a nitrito, pelas Bactérias Oxidantes da Amônia - BOA (*Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus* e *Nitrosovibrio*). Porém, as bactérias que oxidam o nitrito a nitrato (*Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira* e *Nitrospina*) possuem um crescimento mais demorado do que as BOA, levando a um acúmulo ainda maior de nitrito no sistema (VAN LOOSDRECHT e JETTEN, 1998; HAGOPIAN e RILEY, 1998).

CHENG e CHEN (1999) verificaram que a presença do nitrito na hemolinfa do camarão *Penaeus monodon* provocou um aumento da pressão parcial do oxigênio (pO_2), sugerindo um decréscimo da oxihemocianina (hemocianina ligada ao oxigênio). CHEN e CHENG (1995) observaram que os níveis de oxihemocianina e da proteína na hemolinfa de *P. japonicus* reduziram, após a exposição ao nitrito. Isto sugere que o nitrito acumulado na hemolinfa perturba o metabolismo normal do nitrogênio e do sistema respiratório. Os autores concluíram ainda que, em camarões peneídeos expostos ao nitrito, a hemocianina simplesmente não é oxigenada nas brânquias. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade subcrônica do nitrito em sistema de água clara e bioflocos sobre o crescimento, sobrevivência e quantidade de hemócitos totais na hemolinfa de juvenis do camarão *Litopenaeus vannamei* cultivado em sistemas de água clara e bioflocos.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e condições experimentais

O experimento foi realizado na Estação de Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife-PE, Brasil. O estudo foi desenvolvido em 24 tanques de polietileno com área de 0,20 m² e volume útil de 30 L cada,

providos de sistema de aeração individual e contínuo, mantidos por meio de um compressor radial de 2 CV.

Desenho experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com um arranjo fatorial 4 x 2, e aplicado para avaliar as concentrações de nitrito (0 - Controle, 10, 20 e 40 mg N-NO₂ L⁻¹) e os sistemas de cultivo - água clara e bioflocos, constando de três repetições para cada tratamento. Para avaliar o efeito tóxico do nitrito, foram utilizados juvenis de *L. vannamei* com peso médio de 1,60±0,06 g, estocados aleatoriamente nas unidades experimentais, numa densidade de 75 camarões m⁻² (15 camarões tanque⁻¹), e criados em um período de 30 dias. Os tratamentos com água clara foram denominados de 'A-0', 'A-10', 'A-20' e 'A-40', enquanto os tratamentos com bioflocos, referidos como 'B-0', 'B-10', 'B-20' e 'B-40'.

Solução teste e manejo dos tanques

As concentrações experimentais foram obtidas por meio de solução estoque de N-nitrito, preparada a partir da dissolução de 49,24 g nitrito de sódio P.A. em 1 L de água destilada, para se obter uma concentração de 10.000 mg N-NO₂ L⁻¹ (CHAND e SAHOO, 2006). Para manter as concentrações experimentais de nitrogênio do nitrito, o volume útil dos tanques (100%) foi renovado a cada três dias, e as soluções de N-nitrito adicionadas novamente para a manutenção das concentrações experimentais. Diariamente, realizou-se o sifonamento das sobras de alimento e outros resíduos orgânicos nos tanques experimentais.

No tratamento com bioflocos, os tanques foram abastecidos com uma mistura de 50% água clara e 50% água de bioflocos, oriunda de um cultivo de camarões com tecnologia de bioflocos (BFT) em desenvolvimento na Estação de Aquicultura da UFRPE. Durante o período experimental, não foi necessário o uso de melado de cana-de-açúcar como fonte de carbono orgânico, já que os níveis de nitrogênio da amônia total estavam abaixo de 1 mg NAT L⁻¹.

Os animais foram alimentados com ração comercial peletizada contendo 35% proteína bruta (Camanutri, 35% PB, Presence®), fornecida em

bandejas uma vez ao dia (9:00 horas) durante 30 dias de cultivo. A taxa de alimentação foi inicialmente estabelecida de acordo com JORY *et al.* (2001).

Semanalmente, realizaram-se biometrias com amostras equivalentes a 40% da população de cada parcela experimental. O desempenho zootécnico dos camarões foi acompanhado através do peso inicial (g), peso final (g), taxa de crescimento específico (% dia⁻¹) e, ao final do cultivo, avaliou-se a sobrevivência (S%) dos camarões.

Contagem total de hemócitos

Durante o período experimental, um camarão de cada unidade experimental foi coletado para contagem total de hemócitos (CTH), a cada cinco dias a contar da estocagem até o final do experimento. A hemolinfa foi retirada da região ventral do hemocelo, no início do primeiro segmento abdominal de cada animal. Para determinar a CTH, a hemolinfa de cada camarão foi coletada utilizando de 1 mL diretamente de uma solução anticoagulante na proporção de 1:4 (solução de Alsever modificado: citrato de sódio 27 mM, 336 mM cloreto de sódio, glicose 115 mM, EDTA a 9 mM, pH 7,0) (MAGGIONI *et al.*, 2004). O material foi colocado individualmente em microtubos e mantido sob refrigeração (HENNIG *et al.*, 1998). A contagem total de hemócitos foi determinada individualmente, utilizando-se uma câmara de Neubauer e um microscópio óptico binocular (Coleman N-120-T, 10x ampliação), seguindo o método utilizado na contagem de células sanguíneas humanas (COSTA e MARTINS, 2009).

Parâmetros de qualidade da água

Durante o período experimental, a temperatura, oxigênio dissolvido, pH e salinidade da água foram verificados em cada tanque, duas vezes ao dia (8:00 e 16:00 h), com a utilização de multiparâmetro YSI 556 MPS (YSI Incorporation, Ohio, USA). A cada três dias, foram coletadas amostras de água de cada tanque para determinação das concentrações de nitrogênio da amônia total (TAN) e nitrogênio do nitrito (N-NO₂). Previamente às análises, filtraram-se as amostras utilizando filtro analítico de 0,45 µm. Os

compostos nitrogenados foram mensurados utilizando os métodos HACH TNT 830 (método salicilato) e 8507 (método de diazotização) para TAN e N-NO₂, respectivamente. As amostras foram lidas através de espectrofotômetro digital Hach DR 2800 (Hach Company, Colorado, USA).

Análise dos dados

As variáveis de crescimento dos camarões (peso inicial, peso final, sobrevivência, taxa de crescimento específico), bem como a contagem de hemócitos e as variáveis de qualidade da água, foram analisadas utilizando-se a análise de variância (ANOVA) para determinar o efeito das concentrações de nitrito (0, 10, 20, 40 mg N-NO₂ L⁻¹) e sua interação com o sistema de cultivo, água clara x bioflocos, ao nível de significância de 5%. Os dados de sobrevivência foram transformados por meio da função $\arcsen x^{0.5}$. Os testes de normalidade de D'Agostino-Pearson e o homocedasticidade de Cochran foram efetuados antes das análises para verificar a normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias. Nos casos onde houve diferença significativa entre os tratamentos, aplicou-se o teste de Tukey para comparação das médias, ao nível de significância de 5% (ZAR, 1996).

RESULTADOS

Os valores médios de temperatura da água, oxigênio dissolvido, pH, salinidade, nitrogênio da amônia total (NAT) e nitrogênio do N-nitrito, monitorados durante o período experimental, estão apresentados na Tabela 1. Não foram encontradas diferenças significativas entre as variáveis de qualidade da água ($P \geq 0,05$). Apenas na salinidade verificou-se diferença significativa entre os sistemas de cultivo, e na interação entre as concentrações de N-nitrito e os sistemas de cultivo ($P < 0,05$).

Durante o período de cultivo, a temperatura média foi de 28,7°C, variando de 25,4 a 33,2°C. A

salinidade mínima (24,0 g L⁻¹) e máxima (27,2 g L⁻¹) indicou uma pequena variação, registrando uma média de 26,0 g L⁻¹. O oxigênio dissolvido e o pH apresentaram concentrações médias de 5,64 mg L⁻¹ (4,52 a 6,80 mg L⁻¹) e 8,09 (7,47 - 8,60), respectivamente.

Com relação às concentrações do nitrogênio da amônia, foram registradas diferenças significativas entre os sistemas de cultivo, com a menor média sendo registrada no tratamento com sistema de bioflocos (0,21±0,17 mg NAT L⁻¹). Durante o período experimental, os níveis do NAT mantiveram-se inferiores a 1,0 mg NAT L⁻¹, em todos os tratamentos, variando de 0,15 a 0,74 mg NAT L⁻¹. Os dados do desempenho zootécnico dos camarões, após 30 dias de cultivo, em relação às concentrações de N-nitrito e os sistemas de cultivo, estão apresentados na Tabela 2. O peso inicial não apresentou diferença significativa entre os tratamentos ($P \geq 0,05$). O peso médio final registrado ao final do experimento foi de 2,75±0,56 g, resultando em um ganho de peso médio de 1,15 g. O peso final foi significativamente inferior no tratamento, com maior concentração de N-nitrito (40 mg L⁻¹), quando comparado aos tratamentos com menores concentrações de N-nitrito (0-Controle, 10 e 20 mg L⁻¹), os quais não diferiram entre eles. Observaram-se diferenças significativas nas interações entre os sistemas de cultivo e as diferentes concentrações de nitrito ($P < 0,05$), com o sistema de água clara apresentando a menor média de peso final (2,46±0,57 g).

As taxas de crescimento específico (TCE) foram significativamente inferiores nos tratamentos com maiores concentrações de nitrito (20 e 40 mg N-NO₂ L⁻¹), quando comparados aos tratamentos 0 (controle) e 10 mg N-NO₂ L⁻¹ ($P < 0,05$). O efeito dos sistemas de cultivo e suas interações com as concentrações de N-nitrito foram significativamente diferentes para este parâmetro ($P < 0,05$), registrando-se a menor média no sistema de água clara (1,39 % dia⁻¹).

Tabela 1. Médias e desvio-padrão das variáveis físico-químicas de qualidade da água durante o período experimental do camarão *Litopenaeus vannamei*, criado em sistema de água clara e bioflocos com diferentes concentrações de N-nitrito, por 30 dias.

Sistema de cultivo (SC)	Concentração nominal N-NO ₂ (mg L ⁻¹)	Temp (°C)	OD (mg L ⁻¹)	pH	Sal (g L ⁻¹)	NAT (mg L ⁻¹)	Concentração real N-NO ₂ (mg L ⁻¹)
Água clara	0	28,58±1,48	5,69±0,34	8,0±0,10	26,18±1,07	0,60±0,46	0,11±0,11
	10	28,58±0,94	5,67±0,25	8,1±0,09	26,55±1,09	0,58±0,40	10,0±0,6
	20	28,51±1,23	5,71±0,29	8,07±0,25	26,22±0,96	0,58±0,37	21,6±1,0
	40	28,91±0,88	5,60±0,28	8,08±0,12	26,28±0,87	0,74±0,62	40,9±3,1
Bioflocos	0	28,67±1,06	5,66±0,29	8,12±0,17	25,60±0,44	0,15±0,13	0,32±0,09
	10	28,85±1,17	5,59±0,30	8,1±0,14	25,60±0,44	0,22±0,19	10,0±2,1
	20	28,95±1,22	5,67±0,26	8,11±0,17	25,54±0,57	0,23±0,20	22,0±1,8
	40	28,85±1,16	5,53±0,37	8,08±0,16	26,17±3,14	0,23±0,15	37,7±4,0
Efeito SC		NS	NS	NS	*	*	
Água clara		28,65±1,17	5,67±0,30	8,07±0,16	26,31±0,98 ^b	0,63±0,47 ^b	
Bioflocos		28,65±1,17	5,61±0,31	8,10±0,16	25,65±0,56 ^a	0,21±0,17 ^a	
Efeito N-NO ₂ (mg L ⁻¹)		NS	NS	NS	NS	NS	NS
0		26,62±1,29	5,68±0,32	8,08±0,15	25,89±0,85	0,41±0,42	0,22±0,2
10		28,72±1,07	5,63±0,28	8,10±0,12	26,07±0,95	0,43±0,37	10,0±1,5
20		28,73±1,24	5,69±0,28	8,09±0,21	25,88±0,85	0,44±0,35	21,8±1,2
40		28,88±1,02	5,57±0,33	8,08±0,14	26,08±0,81	0,53±0,44	39,8±4,5
Interação SC Bioflocos x N-NO ₂ (mg L ⁻¹)		NS	NS	NS	*	NS	

*Valores apresentados como médias ± desvio padrão. AC - cultivo em água clara; BFT - cultivo com bioflocos; AC x BFT - interação das concentrações de N-NO₂ com o sistema de cultivo. Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05) NS = não significativo (P≥0,05). *P<0,05. Temperatura da água (Temp); Oxigênio dissolvido (OD); Salinidade (Sal); Concentração de N-nitrito em mg L⁻¹ (N-NO₂).

O efeito tóxico do nitrito aumentou com o tempo de exposição e o aumento das concentrações. Mortalidades foram observadas a partir do vigésimo dia de cultivo. A taxa de sobrevivência foi significativamente inferior no tratamento com maior concentração de N-NO₂ (40 mg L⁻¹), quando comparado aos tratamentos com menores concentrações de N-NO₂ (0 - Controle, 10 e 20 mg L⁻¹) (P<0,05). Já para a interação entre os sistemas de cultivo e as concentrações de N-nitrito, não houve diferença significativa (P≥0,05). As menores taxas de sobrevivência foram 85,2±12,8 e 40,7±23,1%, registradas nos

tratamentos A-20 e A-40, respectivamente. Ao final do cultivo, a sobrevivência média para os tratamentos água clara e bioflocos foi de 79,6 e 84,2%, respectivamente.

A contagem total de hemócitos para as concentrações de N-nitrito, sistemas de cultivo e suas interações está apresentada na Tabela 3 (P≥0,05). A CTH variou de 1,4 a 3,7 x 10³ cel mm⁻³ entre os tratamentos (P≥0,05). Não se observou diferença significativa na interação entre as concentrações de N-nitrito e os sistemas de cultivo, com relação à contagem total de hemócitos (P≥0,05).

Tabela 2. Variáveis de desempenho do camarão *Litopenaeus vannamei* criado por 30 dias em sistema de água clara e de bioflocos com diferentes concentrações de N-NO₂ (mg L⁻¹). Peso inicial (Pi); Peso final (Pf); Sobrevivência (Sob); Taxa de crescimento específico (TCE).

Sistema de cultivo (SC)	N-NO ₂ (mg L ⁻¹)	Pi (g)	Pf (g)	Sob (%)	TCE (% dia ⁻¹)
Água clara	0	1,55±0,30	2,97±0,10	96,30±6,42	2,15±0,05
	10	1,59±0,13	2,87±0,43	96,30±6,42	1,95±0,54
	20	1,56±0,02	2,31±0,31	85,19±12,83	1,29±0,47
	40	1,63±0,06	1,71±0,07	40,74±23,13	0,15±0,22
Bioflocos	0	1,62±0,02	3,36±0,22	74,07±6,42	2,42±0,24
	10	1,60±0,09	3,06±0,52	85,19±6,42	2,14±0,64
	20	1,63±0,05	2,81±0,22	85,19±6,42	1,82±0,16
	40	1,61±0,06	2,90±0,41	92,59±12,83	1,93±0,33
Efeito SC		NS	*	NS	*
Água clara		1,58±0,07	2,46±0,57 ^a	79,63±26,73	1,39±0,88 ^a
Bioflocos		1,62±0,05	3,04±0,38 ^b	84,26±12,04	2,08±0,41 ^b
Efeito N-NO ₂ (mg L ⁻¹)		NS	*	*	*
0		1,59±0,04	3,17±0,26 ^c	85,19±13,46	2,29±0,22 ^c
10		1,59±0,10	2,97±0,44 ^{bc}	90,74±12,99	2,04±0,54 ^{bc}
20		1,59±0,05	2,56±0,37 ^{ab}	85,19±9,07	1,56±0,43 ^{ab}
40		1,62±0,05	2,30±0,70 ^a	66,67±32,96	1,04±1,01 ^a
Interação SC Bioflocos x N-NO ₂ (mg L ⁻¹)		NS	*	NS	NS

*Valores apresentados como médias ± desvio padrão. AC - cultivo em água clara; BFT - cultivo com bioflocos; AC x BFT - interação das concentrações de N-NO₂ com o sistema de cultivo. Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05) NS = não significativo (P≥0,05). * P<0,05. TCE - Taxa de crescimento específico = 100 x (ln Pf - ln Pi)/T; Pi - peso inicial, Pf - peso final.

Tabela 3. Contagem total de hemócitos (CTH) dos camarões submetidos a diferentes concentrações de nitrogênio do nitrito em dois sistemas de cultivo - água clara e bioflocos (média±desvio padrão).

Sistema de cultivo (SC)	N-NO ₂ (mg L ⁻¹)	CTH (cel mm ⁻³)
Água clara	0	3,6 x 10 ³ (±2,8)
	10	3,0 x 10 ³ (±3,5)
	20	2,2 x 10 ³ (±1,5)
	40	1,4 x 10 ³ (±1,1)
Bioflocos	0	2,9 x 10 ³ (±3,0)
	10	2,7 x 10 ³ (±2,9)
	20	4,3 x 10 ³ (±5,5)
	40	3,7 x 10 ³ (±4,6)
Efeito Sistema de cultivo		NS
Água clara		2,5 x 10 ³ (±2,5)
Bioflocos		3,4 x 10 ³ (±4,1)
Efeito N-NO ₂ (mg L ⁻¹)		NS
0		3,2 x 10 ³ (±2,9)
10		2,9 x 10 ³ (±3,2)
20		3,2 x 10 ³ (±4,1)
40		2,6 x 10 ³ (±3,5)
Interação SC BFT x N-NO ₂ (mg L ⁻¹)		NS

*Valores apresentados como médias ± desvio padrão. ⁽¹⁾ Média de seis repetições. ⁽²⁾ Média de doze repetições. AC - cultivo em água clara; BFT - cultivo com bioflocos; AC x BFT - interação das concentrações de N-NO₂ com o sistema de cultivo; Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05) entre os tratamentos pelo teste de Tukey. NS = não significativo (P≥0,05). * P<0,05.

DISCUSSÃO

Durante o período experimental, as médias da temperatura (28,7°C) e da salinidade (26 g L⁻¹) permaneceram dentro da faixa recomendada ao melhor desenvolvimento do *L. vannamei* (PONCE-PELAFOX, 1997). As concentrações médias de pH e oxigênio dissolvido foram 8,09 e 5,64 mg L⁻¹, consideradas ideais para a criação de camarões peneídeos (VAN WYK e SCARPA, 1999). Dessa forma, temperatura, salinidade, pH e oxigênio dissolvido foram favoráveis ao crescimento e à sobrevivência dos camarões.

Dentre os compostos nitrogenados inorgânicos, os mais importantes no cultivo de organismos aquáticos são o nitrogênio da amônia total (NAT), o nitrogênio do nitrito (N-NO₂) e o nitrato (NO₃). O acúmulo desses compostos nos tanques de cultivo pode reduzir o crescimento; aumentar o consumo de oxigênio e a excreção dos animais; além de alterar as concentrações dos níveis de proteína e aminoácidos livres da hemolinfa dos camarões, causando elevada mortalidade (LIN e CHEN, 2001, 2003; KUHN *et al.*, 2010). Durante o período experimental, as concentrações do nitrogênio da amônia total mantiveram-se inferiores a 1 mg NAT L⁻¹. Em nosso estudo, o inóculo de bioflocos (50% do volume) para os tanques do tratamento BFT sugerem que a comunidade de bactérias oxidantes da amônia (BOA) estava estabelecida, devido às baixas concentrações registradas para esse composto. Segundo LIN e CHEN (2001), o nível de segurança estimado para N-NH₃ é de 0,16 mg L⁻¹ ou 3,55 mg NAT L⁻¹ em 25 g L⁻¹ de salinidade, para juvenis do camarão *L. vannamei*.

O nitrito tem uma influência sobre diversas funções biológicas; quando presente na água é rapidamente incorporado à hemolinfa e ao intestino dos camarões, através da absorção branquial, e se acumula nos tecidos (CHENG e CHEN, 2000). O acúmulo de nitrito na água pode retardar o crescimento do camarão, aumentar a muda e, em casos extremos, causar a morte (CHEN e CHEN, 1992). No presente estudo, o peso final dos camarões foi significativamente influenciado pelas diferentes concentrações de nitrito pelos sistemas de cultivo e suas interações (P<0,05). Os camarões submetidos ao tratamento com sistema de água clara registraram as menores médias de peso final, acompanhados pelos

tratamentos com sistema de bioflocos nas concentrações mais elevadas de N-nitrito (20 e 40 mg L⁻¹). Nossos resultados foram similares aos obtidos por FURTADO *et al.* (2016), que, ao avaliarem a toxicidade crônica do nitrito para o camarão *L. vannamei* cultivado em duas salinidades (8 e 24 g L⁻¹), observaram diferenças significativas entre os dois grupos, e uma redução significativa no crescimento dos camarões com a elevação dos níveis de nitrito (0, 5, 10 e 20 mg N-NO₂ L⁻¹). Do mesmo modo, CAMPOS *et al.* (2015) registraram diferenças significativas no peso médio final dos camarões *Farfantepenaeus brasiliensis* submetidos à toxicidade crônica da amônia, nitrito e nitrato, por 40 dias. Os autores relataram que o crescimento foi negativamente relacionado com os níveis mais elevados de nitrito (5,3 e 10,6 mg N-NO₂ L⁻¹).

Segundo CORREIA *et al.* (2014), em sistema de cultivo com bioflocos, o crescimento de pós-larvas do camarão *L. vannamei* pode ser reduzido quando expostas a concentrações de N-nitrito igual ou maior que 29 mg L⁻¹. Por outro lado, MELO *et al.* (2015) não observaram diferenças significativas no crescimento do camarão *L. vannamei* cultivado em sistema de bioflocos, quando exposto a concentrações de 19,5 e 27,4 mg N-NO₂ L⁻¹. Em nosso estudo, ao avaliar o sistema de bioflocos, a taxa de crescimento específico registrou as menores médias (1,82 e 1,93% dia⁻¹) para os tratamentos com maiores concentrações de N-NO₂ (20 e 40 mg L⁻¹ - B-20 e B-40, respectivamente). CAMPOS *et al.* (2013) registraram TCE variando de 1,18 a 1,27 % dia⁻¹, ao avaliarem os efeitos crônicos da amônia, nitrito e nitrato no consumo alimentar do camarão *Farfantepenaeus brasiliensis*. Do mesmo modo, CAMPOS *et al.* (2014), trabalhando com a mesma espécie, registraram taxas de crescimento de 2,22, 2,46 e 2,12% dia⁻¹ para concentrações de 5,36, 10,64 e 21,21 mg N-NO₂ L⁻¹, durante 30 dias cultivo. No presente estudo, no tratamento do sistema de cultivo água clara, foram registradas taxas de crescimento específico de 2,15, 1,95, 1,29 e 0,15 % dia⁻¹ para as concentrações 0-Controle, 10, 20 e 40 mg N-NO₂ L⁻¹, respectivamente. Nossos resultados sugerem que os camarões cultivados no sistema de bioflocos podem obter maior resistência às concentrações mais elevadas de N-nitrito.

Elevadas concentrações de nitrito nos sistemas de cultivo acarretam efeitos tóxicos aos camarões cultivados a curto e longo prazo, podendo afetar o crescimento e a sobrevivência dos animais e causando prejuízo na produção (VINATEA *et al.*, 2010; LIN e CHEN, 2003). Em nosso estudo, ao final de 30 dias de cultivo, registrou-se uma sobrevivência média de 85,2, 90,7, 85,2 e 66,7% para as concentrações de 0-Controle, 10, 20 e 40 mg N-NO₂ L⁻¹, respectivamente ($P < 0,05$). GROSS *et al.* (2004), ao estudarem a toxicidade do nitrito para o camarão *L. vannamei* cultivado por 21 dias em água com baixa salinidade (2g L⁻¹), registraram sobrevivência média de 50% para as concentrações de 0, 1, 2 e 4 mg N-NO₂ L⁻¹ e 20% para a concentração de 8 mg N-NO₂ L⁻¹. CAMPOS *et al.* (2013) registraram taxas de sobrevivência superiores a 90% ao cultivarem o camarão *Farfantepenaeus brasiliensis* (70 juvenis m⁻²) por 28 dias de exposição crônica às concentrações de 5,63, 10,64 e 21,21 mg L⁻¹ de N-NO₂. Segundo BUIKEMA *et al.* (1982), testes de toxicidade aguda podem fornecer informações sobre a letalidade de substâncias tóxicas, mas não podem prever a concentração que tem efeitos subletais e crônicos sobre os organismos. LIN e CHEN (2003) estimaram o nível de segurança de 15,2 e 25,7 mg N-NO₂ L⁻¹ para as salinidades de 25 e 35 g L⁻¹ para juvenis de *L. vannamei*, respectivamente. Por sua vez, CORREIA *et al.* (2014) avaliaram o efeito de duas rações comerciais (30 e 40% proteína bruta) em sistema de bioflocos, registrando índices acima de 82% na sobrevivência de pós-larvas de *L. vannamei* criadas em raceways (5000 PL m⁻³) por 62 dias, onde registraram concentrações máximas de 34 e 29 mg N-NO₂ L⁻¹.

CHENG e CHEN (2001) relatam que a contagem total de hemócitos (CTH) é um dos parâmetros mais utilizados para avaliar o estado de saúde dos camarões, e pode variar em resposta ao estresse ambiental, atividade endócrina, ciclo de muda e infecções virais ou bacterianas (JOHANSSON *et al.*, 2000; JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2006). No presente estudo, não foram observadas interações significativas entre as concentrações de nitrito e os sistemas de cultivo com relação à contagem total de hemócitos ($P \geq 0,05$). Segundo BARRETTO *et al.* (2012), contagens de hemócitos abaixo de 5×10^6 cel mm⁻³

são consideradas baixas ou muito baixas, superiores às registradas no presente estudo.

TSENG e CHEN (2004) examinaram os efeitos ao estresse do nitrito no camarão *L. vannamei*, na resposta imune ao *Vibrio alginolyticus*. Eles detectaram que o camarão exposto a concentrações de nitrito entre 5 e 22 mg N-NO₂ L⁻¹ apresentaram resistência significativamente reduzida à infecção bacteriana. Este estudo foi realizado por meio de análises da contagem de hemócitos (células vermelhas do sangue dos invertebrados). CHEN e CHEN (1992) observaram que as concentrações de nitrito na hemolinfa do camarão *Penaeus japonicus* foram maiores que as concentrações testes (2, 4, 8 e 20 mg N-NO₂ L⁻¹), após 16 horas de exposição.

CONCLUSÕES

Os camarões submetidos à toxicidade do nitrogênio do nitrito, na presença de bioflocos, foram mais resistentes quando comparados àqueles criados em água clara. Dessa forma, a sobrevivência dos camarões não foi comprometida para os tratamentos com a tecnologia de bioflocos. As concentrações de nitrito de 20 e 40 mg N-NO₂ L⁻¹ para os dois sistemas de cultivo - água clara e bioflocos afetaram o crescimento do camarão *Litopenaeus vannamei*. Complementarmente, nas condições experimentais adotadas, a quantidade total de hemócitos não foi influenciada pelas concentrações do nitrogênio do nitrito ou pelos sistemas de cultivo, mas registraram concentrações inferiores às consideradas adequadas pela literatura.

AGRADECIMENTOS

À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) no âmbito do Programa Nacional de Carcinicultura (RECARCINA), pelo suporte financeiro. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de Pós-Graduação.

REFERÊNCIAS

- ASADUZZAMAN, M.; WAHAB, M.A.; VERDEGEM, M.C.J.; HUQUE, S., SALAM; M.A., AZIM, M.E. 2008 C/N ratio control and substrate addition for periphyton development jointly enhance freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* production ponds. *Aquaculture*, 280(1-4): 117-123.
- AZIM, M.E.; LITTLE, D.C. 2008 The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 283(1-4): 29-35.
- BARBIERI, E.; BONDIOLI, A. C. V.; MELO, C. B.; HENRIQUES, M. B. 2014 Nitrite toxicity to *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936, Crustacea) at different salinity levels. *Aquaculture Research*, 47(4): 1260-1268.
- BARBIERI, E. 2010 Acute toxicity of ammonia in White shrimp (*Litopenaeus schmitti*) (Burkenroad, 1936, Crustacea) at different salinity levels. *Aquaculture*, 302(1-4): 231-237.
- BARRETTO, A.C.G.; GÓES, L.M. N.; NASCIMENTO, D.L.; MENDES, P.P.; RÊGO, E.W.; MENDES, E.S. 2012 Influência da refrigeração na preservação do número total de hemócitos de camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* cultivados utilizando-se citrato de sódio. *Ciência Animal Brasileira*, 13(4): 520-524.
- BUIKEMA, A.L.; NIEDERLEHNER, R.R.; CAIRNS, J.J. 1982 Biological monitoring Part IV. Toxicity testing. *Water Reserch*, 16: 239-262.
- BROWNELL, C.L. 1980 Water quality requirements for first feeding in marine fish larvae: ammonia, nitrite and nitrate. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 44(2): 269-283.
- CAMPOS, B.R.; FURTADO, P.S.; D'INCAO, F.; WASIELESKY, W.; POERSCH, L.H.S. 2013 Compostos nitrogenados sobre o consumo alimentar de camarão-rosa *Farfantepenaeus brasiliensis*. *Ciência Rural*, 43(12): 2202-2207.
- CAMPOS, B.R.; FURTADO, P.S.; D'INCAO, F.; POERSCH, L.H.; WASIELESKY JR., W. 2014 The effect of ammonia, nitrite, and nitrate on the oxygen consumption of juvenile pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) (Crustacea:Decapoda). *Journal of Applied Aquaculture*, 261(1): 94-101.
- CAMPOS, B.R., FURTADO, P.S., D'INCAO, F., POERSCH, L., WASIELESKY, W. 2015 The chronic toxicity of ammonia, nitrite and nitrate on juvenile *Farfantepenaeus brasiliensis* (Crustacea: Decapoda). *Boletim do Instituto de Pesca*, 41(2): 261-269.
- CHAMBERLAIN, G.; AVNIMELECH, Y.; McINTOSH, R. P.; VELASCO, M. 2001 Advantages of aerated microbial reuse systems with balanced C:N - I: Nutrient transformation and water quality benefits. *The Global Aquaculture Advocate*, p.53-56.
- CHAND, R.K, SAHOO, P.K. 2006 Effect of nitrite on the immune response of freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* and its susceptibility to *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 258(1-4): 150-156.
- CHEN, J.C., CHEN, S.F. 1992 Accumulation of nitrite in hemolymph of *Penaeus japonicus*. *Marine Ecology Progress Series*. 83(4): 305-308.
- CHEN, J.C.; CHENG, S.Y. 1995 Changes of oxyhemocyanin and protein levels in the hemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient nitrite. *Aquatic Toxicology*, 33(3-4): 215-26.
- CHEN, J.C., CHIN, C.K., LEE, C.K. 1986 Effects of ammonia and nitrite on larval development of the shrimp *Penaeus monodon*. The First Asian Fisheries Forum. *Asian Fisheries Society*, 657-662.
- CHENG, S.Y., CHEN, J.C. 1999 Hemocyanin oxygen affinity, and the fractionation of oxyhemocyanin and deoxyhemocyanin for *Penaeus monodon* exposed to elevated nitrite. *Aquatic Toxicology*, 45(1): 35-46.
- CHENG, S.Y., CHEN, J.C. 2000 Accumulation of nitrite in the tissues of *Penaeus monodon* exposed to elevated ambient nitrite after different time periods. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 39(2): 183-192.
- CHENG, W., CHEN, J.C., 2001 Effects of intrinsic and extrinsic factors on the hemocyte profile of the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunology*, 11(1): 53-63.
- CORREIA, E.S.; WILKENFELD, J. S.; MORRIS, T.C.; WEI, L.; PRAGNELL, D.I.; SAMOCHA, T.M.

- 2014 Intensive nursery production of the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* using two commercial feeds with high and low protein content in biofloc-dominated system. *Aquacultural Engineering*, 59(3-março): 48-54.
- COSTA, A.M., MARTINS, P.C.C. 2009 Análise da contagem total de hemócitos e capacidade coagulante da hemolinfa do camarão *Litopenaeus Vannamei* (Boone,1931) em cultivos com ocorrência de necrose muscular. *Boletim do Instituto de Pesca*, 35(4): 545-551.
- COLT, J.E.; ARMSTRONG, D.A. 1981 Nitrogen toxicity to fish, crustaceans and molluscs. In: ALLEN, L.J, EC KINNEY. (eds.) *Proceedings of the Bioengineering Symposium for Fish Culture Section*, American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, p.34-47.
- CRAB, R.; AVNIMELECH, Y.; DEFOIRDT, T.; BOSSIER, P.; VERSTRATE, W. 2007 Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture*, 270(1-4): 1-14.
- CRAB, R.; KOCHVA, M.; VERSTRATE, W.; AVNIMELECH, Y. 2009 Bioflocs technology application in over-wintering of tilapia. *Aquacultural Engineering*, 40(3): 105-112.
- EBELING, J.M., TIMMONS, M.B., BISOGNI, J.J. 2006 Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, 257(1-4): 346-358.
- FURTADO, P.S.; CAMPOS, B.R.; SERRA, F.P.; KLOSTERHOFF, M.; ROMANO, L.A.; WASIELESKY JR., W. 2015 Effects of nitrate toxicity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared with biofloc technology (BFT). *Aquaculture International*, 23(1): 315-327.
- FURTADO, P.S., VALENZUELA, M.A.J., RODRIGUEZ-FUENTES, G., CAMPOS, B.R., WASIELESKY JR, W., GAXIOLA, G. 2016 Chronic effect of nitrite on the rearing of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* in two salinities. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 49(3): 201-211.
- FRÍAS-ESPERICUETA, M.G.; PAÉZ-OSUNA, F. 2001 Toxicidad de los compuestos del nitrógeno en camarones, In: PAÉZ-OSUNA, F. (ed.). *Camaronicultura y Medio Ambiente*. El Colegio de Sonora, Mazatlán, Sinaloa, México. p.253-276.
- GROSS, A.; ABUTBUL, S.; ZILBERC, D. 2004 Acute and chronic effects of nitrite on white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, cultured in low-salinity brackish water. *The Journal of the World Aquaculture Society*, 35(3): 315-321.
- HAGOPIAN, D.S.; RILEY, J.G. 1998 A closer look at the bacteriology of nitrification. *Aquacultural Engineering*, 18(4): 223-244.
- HARGREAVES, J.A. 2006 Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquacultural Engineering*, 34(3): 344-363.
- HENNIG, O., ITAMI, T., MAEDA, M., KONDO, M., NATUSKARI, Y., TAKAHASHI, Y. 1998 Analyses of haemolymph immunoparameters in kuruma shrimp infected with penaeid Rod-shaped DNA vírus. *Fish Pathology*, 33(4): 389-393.
- KROUPOVA, H., MACHOVA, J., SVOBODOVA, Z. 2005 Nitrite influence on fish: a review. *Veterinarni Medicina – Czech*, 50(11): 461-471.
- KUHN, D.; SMITH, S.A.; BOARDMAN, G.D.; ANGIER, M.W.; MARSH, L.; FLICK JR, G.J. 2010 Chronic toxicity of nitrate to Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: impacts on survival, growth, antennae length, and pathology. *Aquaculture*, 309(1-4): 109-114.
- JENSEN, F. 2003 Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 135(1): 9-24.
- JIRAVANICHPAISAL, P., LEE, B.L., SÖDERHÄLL, K. 2006 Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*, 211(4): 213-36.
- JOHANSSON, M.W.; KEYSER, P.; SRITUNYALUKS, ANA, K., SÖDERHÄLL, K. 2000 Crustacean hemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, 191(1-3): 45-52.
- JORY, D.E.; CABRERAS, R.T.; DURWOOD, M.D.; FEGAN, D.; LEE, G.P.; LAWRENCE, A.L.; JACKSON, J.C.; MCINTOSH, P.R.; CASTANEDA, A.J. 2001 A global review of shrimp feed management: status and perspectives. *Aquaculture*, The World Aquaculture Society, Baton Rouge.

- LIN, Y.C.; CHEN, J.C. 2001 Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 259(1): 09-119.
- LIN, Y.C.; CHEN, J.C. 2003 Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. *Aquaculture*, 224(1-4): 193-201.
- MAGGIONI, D.S., ANDREATTA, E.R., HERMES, E.M., BARRACCO, M.A. 2004 Evaluation of some hemato-immunological parameters in female shrimp *Litopenaeus vannamei* submitted to unilateral eyestalk ablation in association with a diet supplemented with superdoses of ascorbic acid as a form of immunostimulation. *Aquaculture*, 241(1-4): 501-515.
- MELO, F.P., FERREIRA, M.G.P., LIMA, J.P.V., CORREIA, E.S. 2015 Cultivo do camarão marinho com bioflocos sob diferentes níveis de proteína com e sem probiótico. *Revista Caatinga*, 28(4): 202-210.
- PIERCE, R.H.; WEEKS, J.M.; PRAPPAS, J.M. 1993 Nitrate toxicity to five species of marine fish. *The Journal of the World Aquaculture Society*, 24(1): 105-107.
- PONCE-PALAFIX, J.P. 1997 The Effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture*, 157(1-2): 107-115.
- TAHON, J.P.; HOOFF, D VAN.; VINCKIER, C.; WITTERS, R.; LEY, M.; LONHE, R. 1988 The reaction of nitrite with the haemocyanin of *Astacus leptodactylus*. *The Biochemical Journal*, 249(3): 233-242.
- TIMMONS, M.B.; EBELING, J.M. 2010 Recirculating Aquaculture, 2nd ed. Cayuga Aquaculture Ventures, Ithaca, NY, USA, p.948.
- TOMASSO, J.R.; GAMICHAEL, G.J. 1986 Acute toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to the Guadalupe bass, *Micropterus treculi*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 36(1): 866-870.
- TSENG, I.T.; CHEN, J.C. 2004 The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress. *Fish & Shellfish Immunology*, 17(4): 325-333.
- VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; JETTEN, M.S.M. 1998 Microbiological conversions in nitrogen removal. *Water Science and Technology*, 38(1): 1-7.
- VAN WYK, P.; SCARPA, J. 1999 Water quality requirements and management. In: VAN WYK, P. et al (eds) *Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems*. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee, p.141-162.
- VINATEA, L.; GÁLVEZ, A.O.; BROWDY, C.L.; STOKES, A.; VENERO, J.; HAVEMAN, J.; LEWIS, B.L.; LAWSON, A.; SCHULER, A.; LEFFLER, J.W. 2010 Photosynthesis, water respiration and growth performance of *Litopenaeus vannamei* in a super-intensive raceway culture with zero water exchange: Interaction of water quality variables. *Aquacultural Engineering*, 42(1): 17-24.
- ZAR, J.H., 1996 Biostatistical analysis. Prentice Hall, New Jersey. p.622.