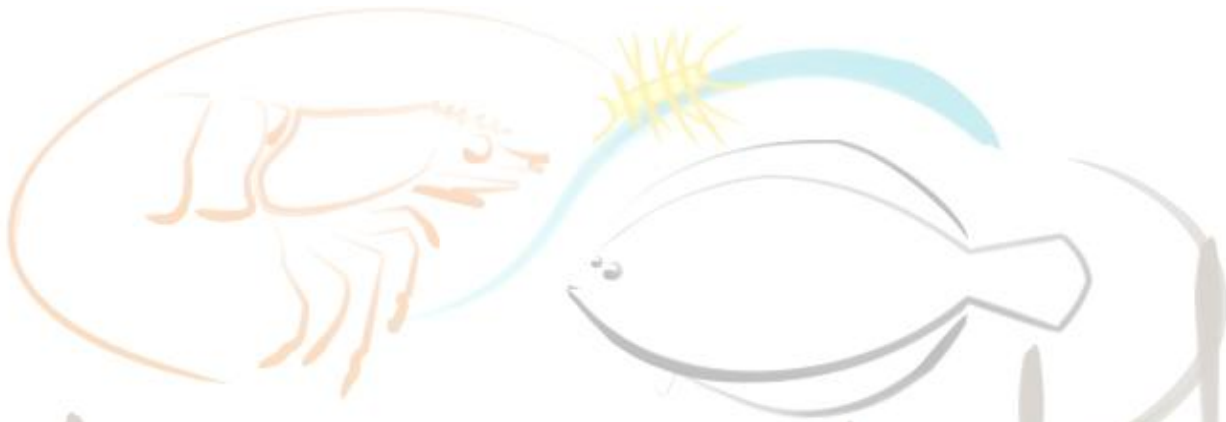




**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



**TOXICIDADE AGUDA DA AMÔNIA E DO NITRITO EM
JUVENIS DO PEIXE-PALHAÇO *Amphiprion ocellaris***

RAFAEL SORIANI MEDEIROS

**RIO GRANDE, RS
Fevereiro 2014**

1 **Universidade Federal do Rio Grande - FURG**
2 **Instituto de Oceanografia**
3 **Programa de Pós-Graduação em Aquicultura**

4

5

6 **TOXICIDADE AGUDA DA AMÔNIA E DO NITRITO EM**
7 **JUVENIS DO PEIXE-PALHAÇO *Amphiprion ocellaris***

8

9 **RAFAEL SORIANI MEDEIROS**

10

11 Dissertação apresentada como parte dos requisitos
12 para a obtenção do grau de mestre em Aquicultura
13 no programa de Pós-Graduação em Aquicultura
14 da Universidade Federal do Rio Grande - FURG.

15

16 Orientador: Dr. Ricardo Vieira Rodrigues

17 Co-orientador: Dr. Luís André Nassr de
18 Sampaio

19

20

21

Rio Grande - RS

22

Fevereiro, 2014

23

24 **Índice**

25	Resumo	1
26	Abstract	2
27	Introdução Geral	3
28	Referências	12
29	Artigo	17
30	<i>Abstract</i>	19
31	<i>Introduction</i>	19
32	<i>Material and methods</i>	21
33	<i>Results</i>	24
34	<i>Discussion</i>	25
35	<i>Acknowledgment</i>	27
36	<i>References</i>	28
37	<i>Tables</i>	33
38	<i>Figures legends</i>	36
39	<i>Figures</i>	37
40	Conclusão Geral	39

41

42

43

44 **Agradecimentos**

45 Agradeço a minha família e a Renata Mont'Alverne pelo apoio dado durante estes
46 anos. Também agradeço ao pessoal que tanto me ajudou no laboratório: Sampaio,
47 Ricardo, Okamoto e Romano . E aos que ajudaram indiretamente e animaram os dias
48 na EMA ou fora dela: Janaina, Léo, Diogo, Bianca, Mario, e todos meus amigos.

49

50 **Resumo**

51 O peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris* muitas vezes é criado em as altas densidades
52 de estocagem que, somadas aos altos níveis proteicos dos alimentos utilizados,
53 elevam as concentrações de amônia e nitrito, que são compostos tóxicos e podem
54 ocasionar a mortalidade dos peixes. No presente estudo, juvenis ($1,20 \pm 0,34$ g) de *A.*
55 *ocellaris* foram expostos a seis concentrações de amônia (0,23; 0,57; 0,97; 1,05; 1,22
56 e 1,63 mg/L $\text{NH}_3\text{-N}$) e oito concentrações de nitrito (26,28; 53,26; 72,48; 111,27;
57 132,38; 157,42; 178,37 e 202,18 mg/L $\text{NO}_2^- \text{-N}$). Foram estimadas as concentrações
58 letais medianas (CL_{50}) para 24, 48, 72, e 96 horas de exposição a estes compostos,
59 sendo 1,06; 0,83; 0,75 e 0,75 mg/L $\text{NH}_3\text{-N}$ e 188,29; 151,01; 124,06 e 108,79 mg/L
60 $\text{NO}_2^- \text{-N}$, respectivamente. As análises histológicas das brânquias revelaram lesões
61 como hiperplasia do epitélio das lamelas primárias, hiperplasia e hipertrofia das
62 células de cloreto e elevação epitelial. Contudo, as frequências das lesões
63 aumentaram de acordo com o aumento nos níveis de amônia e nitrito da água. Os
64 peixes expostos a 0,57 mg/L $\text{NH}_3\text{-N}$ ou 100 mg/L $\text{NO}_2^- \text{-N}$ também apresentaram
65 fusão lamelar. As histopatologias foram significativamente maiores nos peixes
66 expostos a 0,57 mg/L $\text{NH}_3\text{-N}$ ou 25 mg/L $\text{NO}_2^- \text{-N}$ comparados com os peixes
67 controle. Desta forma recomenda-se atenção especial para os níveis de amônia e de
68 nitrito nos sistemas de cultivo de *A. ocellaris*.

69

70 **Abstract**

71 The clownfish *Amphiprion ocellaris* is often raised in high stocking densities and
72 high protein levels fed to maximize the ocellaris production. This increase the
73 concern about ammonia and nitrite once this compounds are toxics and may lead fish
74 to death. In this work, *A. ocellaris* juveniles (1.20 ± 0.34 g) were exposed to six
75 concentrations of ammonia (0.23, 0.57, 0.97, 1.05, 1.22 and 1.63 mg.L⁻¹ NH₃-N) and
76 eight nitrite concentrations (26.28, 53.26, 72.48, 111.27, 132.38, 157.42, 178.37 and
77 202.18 mg.L⁻¹ NO₂⁻-N). The median lethal concentration (LC₅₀) of ammonia and
78 nitrite to *A. ocellaris* clownfish were determined in 1.06, 0.83, 0.75 and 0.75 mg.L⁻¹
79 NH₃-N and 188.29, 151.01, 124.06 and 108.79 mg.L⁻¹ NO₂⁻-N for 24, 48, 72 and 96
80 hours of exposure respectively. Histological analysis showed that both nitrogenous
81 compounds induces gill lesions such as hyperplasia of epithelium cells, hypertrophy
82 of chloride cells and lamellar lifting, and the frequency of levels increasing
83 accordingly the increase of ammonia or nitrite. Fish exposed to 0.57 mg.L⁻¹ NH₃-N
84 and 100 mg.L⁻¹ NO₂⁻-N also presented lamellar fusion, and the histopathologies were
85 significantly higher in fish exposed to 0.57 mg.L⁻¹ NH₃-N or 25 mg.L⁻¹ NO₂⁻-N
86 compared to control fish. Therefore special attention should be given to ammonia and
87 nitrite levels at *A. ocellaris* culture systems.

88

89 **Introdução Geral**

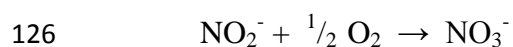
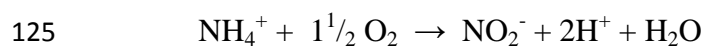
90 O mercado da aquariofilia cresceu significativamente a partir de 1980
91 (Delbeek 2001) e em 1992 já apontava como um dos ramos mais lucrativos da
92 aquicultura norte americana (Chapman *et al.* 1997). Entre 1997 e 2002 a aquariofilia
93 marinha movimentou entre 200 a 330 milhões de dólares e comercializou cerca de
94 1470 espécies de peixes. Apesar da grande diversidade de peixes comercializados,
95 apenas 10 espécies concentraram 36% de todo comércio mundial. Entre essas
96 espécies o peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris*, foi a espécie marinha mais exportada
97 no mundo nesse período (Wabnitz *et al.* 2003). Dados mais recentes mostram que
98 entre maio de 2004 e maio de 2005 *A. ocellaris* junto com *Amphiprion percula* foram
99 o quinto grupo de peixes mais importados pelos Estados Unidos da América (Rhyne
100 *et al.* 2012).

101 O gênero *Amphiprion* foi um dos primeiros a se obter sucesso na reprodução
102 e larvicultura de peixes ornamentais marinhos (Hoff 1996). A produção comercial
103 dos peixes-palhaços vem sendo realizada desde os anos 50 (Wittenrich 2007), e
104 diversos estudos foram realizados com foco na reprodução, larvicultura e
105 intensificação das cores (Ajith Kumar & Balasubramanian 2009; Parmentier *et al.*
106 2009; Yasir & Qin 2009; Ho *et al.* 2013). Casais desse gênero se adaptam bem ao
107 cativeiro e, em condições ideais, podem desovar até duas vezes ao mês, produzindo
108 aproximadamente 24 mil ovos por ano (Madhu *et al.* 2006). Como outras espécies do
109 gênero *Amphiprion*, o *A. ocellaris* possui elevado valor de mercado e pacote
110 tecnológico já estabelecido (Hoff 1996). Atualmente a demanda por *A. ocellaris*
111 produzidos em cativeiro continua grande devido a maior popularidade dos aquários

112 marinhos, as restrições impostas à coleta destes animais no ambiente natural, e a
113 crescente procura dos aquarofilistas por animais produzidos em cativeiro. Dessa
114 forma, para suprir a demanda e otimizar a produtividade, os peixes ornamentais
115 marinhos frequentemente são criados em altas densidades de estocagem em sistemas
116 de recirculação de água (Watson & Hill 2006).

117 Sistemas de recirculação de água suportam maior densidade de peixes que
118 sistemas estáticos convencionais, pois nestes sistemas a água circula constantemente
119 entre os tanques e uma sequência de filtros mecânicos e biológicos, retornando tratada
120 aos tanques. Os filtros biológicos possuem substratos com grande área de superfície
121 para colonização de bactérias nitrificantes, principalmente o gênero *Nitrossomonas*
122 que oxida amônia em nitrito, e o gênero *Nitrobacter* que oxida o nitrito em nitrato
123 (Gutierrez-Wing & Malone 2006).

124 Processo de nitrificação:



127 A amônia e o nitrito são tóxicos para os peixes. Contudo, a toxicidade de
128 ambos é muito variável para peixes, dependendo da espécie, do tamanho e nível de
129 atividade dos peixes e também de parâmetros físico químicos da água como
130 temperatura, oxigênio dissolvido, salinidade, pH, dureza e composição iônica da
131 água. O pH é um dos fatores mais importantes que interferem na toxicidade da
132 amônia, isso por que o pH é o principal fator a alterar o equilíbrio entre amônia
133 gasosa, não ionizada (NH_3), e amônia ionizada (NH_4^+) (Thurston *et al.* 1981). A NH_3
134 é mais tóxica que o NH_4^+ pois esta é uma molécula lipofílica com capacidade de

135 atravessar passivamente as membranas celulares, que são lipoproteicas, entrando
136 facilmente na corrente sanguínea. Para a entrada do íon NH_4^+ , que é lipofóbico, no
137 sangue são necessários transportadores ativos (Randall & Tsui 2002; Ip & Chew
138 2010). Em relação a toxicidade do nitrito, a concentração de cloreto na água é o
139 parâmetro que mais interfere na toxicidade, pois o nitrito entra no sangue
140 principalmente pelo trocador de banda 3 ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) substituindo os íons de cloreto,
141 nas brânquias em peixes de água doce e no intestino em peixes marinhos. Portanto
142 águas com salinidade e concentrações de cloreto mais elevadas podem dificultar a
143 entrada do nitrito no sangue e minimizar sua toxicidade (Sampaio *et al.* 2002,
144 Weirich & Riche 2006a).

145 A amônia é o primeiro composto nitrogenado a surgir em um sistema de
146 criação de peixes, pois é a principal forma de excreção desses organismos. As
147 principais formas de excreção da amônia pelos peixes ocorrem nas brânquias com a
148 saída de NH_3 por difusão e pelas proteínas Rh e a saída de NH_4^+ por transportadores
149 ativos (H^+/Na^+) (Ip & Chew 2010). Outra fonte de amônia é a decomposição de
150 matéria orgânica como restos de alimento presentes nos sistemas aquícolas. Além de
151 ser a primeira a surgir, a amônia é o composto nitrogenado mais tóxico para os peixes
152 levando a mortalidade em concentrações relativamente baixas (Tomasso 1994,
153 Weirich & Riche 2006b). Portanto, problemas com toxicidade de amônia são mais
154 comuns durante o transporte de peixes, onde a densidade de peixes é muito elevada e
155 não existe tratamento, nem renovação da água (Lim *et al.* 2003), assim como em
156 sistemas de produção com elevada densidade de estocagem sem a devida renovação

157 de água ou em caso de sistemas de recirculação biofiltros imaturos ou com perda de
158 eficiência.

159 O aumento da amônia no ambiente pode levar a perda da eficiência na
160 excreção da amônia e com isso os peixes podem diminuir ou cessar a alimentação
161 para diminuir a produção de amônia metabólica, causando redução de crescimento ou
162 até perda de peso. Outro fator que pode acarretar em diminuição do crescimento é que
163 o excesso de amônia a nível celular afeta a produção de ATP reduzindo a energia
164 disponível para o peixe (Russo & Thurston 1977). Foss *et al.* (2004) relataram
165 diminuição das taxas de crescimento e de alimentação no bacalhau do Atlântico,
166 *Gadus morhua*, exposto a concentrações maiores que 0,06 mg/L NH₃-N. A amônia
167 no sangue, que possui pH entre 7,6 e 8,4 (Cameron 1978), encontra-se principalmente
168 na forma ionizada NH₄⁺, sendo capaz de entrar nas células neuronais e de músculo
169 branco através dos canais de potássio. Isto leva a um desbalanço nas cargas elétricas
170 das células e atrapalha a atividade e comunicação celular (Randall & Tsui 2002;
171 Baldisserotto 2013). Com o excesso de amônia também ocorre alteração no pH
172 sanguíneo desestabilizando reações enzimáticas e as membranas celulares, e levando
173 a alterações histológicas em diversos órgãos. O peixe-palhaço maroon, *Premnas*
174 *biaculeatus* apresentou histopatologias nos rins, fígado, cérebro, e brânquias quando
175 expostos por 96 h a 0,75 mg/L NH₃-N (Rodrigues *et al.* 2012). A alteração no pH
176 sanguíneo também acarreta na diminuição da capacidade de carrear o oxigênio que
177 somada aos danos histológicos das brânquias, acabam exigindo maior frequência
178 respiratória e conseqüentemente maior gasto energético (Vinatea Arana 2004). A
179 amônia também pode levar a mortalidades e a concentração letal mediana (CL₅₀) 96 h

180 em peixes marinhos varia de 0,54 mg/L NH₃-N para o robalo negro, *Centropristis*
 181 *striata* (Weirich & Riche 2006a) até 2,6 mg/L NH₃-N para o linguado *Scophthalmus*
 182 *maximus* (Person-Le Ruyet *et al.* 1995). O único estudo de toxicidade aguda da
 183 amônia em peixes-palhaços utilizou o maroon *Premnas biaculeatus*, e relatou CL₅₀
 184 96 h de 0,89 mg/L NH₃-N (Rodrigues *et al.* 2012) (Tabela1).

185 Tabela 1. Concentração letal mediana de amônia não ionizada para diversas espécies
 186 de peixes.

Espécie	Peso (g)	Temperatura (°C)	pH	Salinidade	CL ₅₀ -96h mg/L NH ₃ -N	Referência
<i>Centropristis striata</i>	9,9	22,2	8,29	9,9	0,46	Weirich & Riche 2006a
		22,3	8,21	20,0	0,52	
		22,3	8,23	30,1	0,54	
<i>Premnas biaculeatus</i>	0,34	24,5	7,9	21,5	0,89	Rodrigues <i>et al.</i> 2012
<i>Trachinotus carolinus</i>	8,1	27,8	8,36	5,8	0,95	Weirich & Riche 2006b
		27,7	8,36	11,6	1,01	
		27,9	8,33	25	0,97	
<i>Rachycentron canadum</i>	1,74	25,9	7,8	22,2	1,13	Rodrigues <i>et al.</i> 2007
<i>Trachinotus marginatus</i>	0,86	24,3	7,3	5	0,66	Costa <i>et al.</i> 2008
		24,2	7,7	10	1,87	
		24,3	8,1	30	1,06	
<i>Scophthalmus maximus</i>	6 a 163	17 a 18	8,15	34,5	2,6	Person-Le Ruyet <i>et al.</i> 1995

188 O nitrito (NO_2^-) encontra-se na água em equilíbrio com o ácido nítrico
189 (HNO_2) dependendo do pH, sendo que pHs acima de 5,5 apresentam somente o
190 nitrito (Baldisseroto 2013). O nitrito é o intermediário no processo de nitrificação
191 surgindo da oxidação da amônia realizada principalmente pelas bactérias
192 *Nitrossomonas*. Picos de nitrito são mais frequentes em sistemas de produção e em
193 aquários durante os primeiros meses após a estocagem dos peixes quando a eficiência
194 das bactérias nitrito oxidantes, *Nitrobacter*, do biofiltro ainda não está em equilíbrio
195 com a produção de nitrito do sistema (Svobodová *et al.* 2005; Gutierrez-Wing &
196 Malone 2006). Porém, mesmo em um sistema maturo pode ocorrer perda de
197 eficiência na oxidação do nitrito pelo biofiltro levando ao acúmulo desse composto
198 no sistema de produção. Emparanza (2009) sugere que grande variabilidade diária na
199 quantidade de ração ofertada e/ou na quantidade de água renovada no sistema são os
200 principais fatores que ocasionam perda da eficiência do biofiltro causando aumento
201 do nitrito.

202 Dentro do sangue, o principal efeito do nitrito é a oxidação do Fe^{2+} da
203 hemoglobina para Fe^{3+} transformando-a em meta-hemoglobina e reduzindo
204 capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue podendo levar a mortalidade os
205 peixes por hipóxia (Kroupova *et al.* 2005). O nitrito também estimula a saída de K^+
206 das hemácias para o plasma o que leva a uma saída de água das hemácias por osmose
207 diminuindo o hematócrito por redução do volume das hemácias e também afetando a
208 capacidade de transporte de oxigênio dos peixes (Baldisserotto 2013). No bijupirá,
209 *Rachycentron canadum*, foi observado interrupção da alimentação e problemas na
210 natação quando expostos a 76,1 e 88,8 mg/L NO_2^- -N respectivamente (Rodrigues *et*

211 *al.* 2007). O nitrito também pode causar mortalidades, e em geral as CL₅₀ do nitrito
212 são mais elevadas que as CL₅₀ da amônia. A CL₅₀ 96 h de nitrito para a tainha *Mugil*
213 *liza* é de 1,51 mg/L NO₂⁻-N em salinidade zero e de 35,89 mg/L NO₂⁻-N em
214 salinidade 30 (Sampaio *et al.* 2002), resultado semelhante ao do pampo *Trachinotus*
215 *carolinus* com CL₅₀ 96 h de 16,7 mg/L NO₂⁻-N em salinidade 6,3 e 34,2 mg/L NO₂⁻-
216 N em salinidade 25 (Weirich & Riche 2006b). Já a CL₅₀ 96 h para *Centropristis*
217 *striata* na salinidade 30 é de 216,4 mg/L NO₂⁻-N (Weirich & Riche 2006a),
218 demonstrando a grande variabilidade na toxicidade desse composto entre as espécies.
219 Outro peixe resistente ao nitrito é o bijupirá *Rachycentron canadum*, que apresentou
220 somente 30% de mortalidade quando exposto a 210 mg/L NO₂⁻-N durante 96 h
221 (Rodrigues *et al.* 2007) (Tabela 2).

222 Como visto anteriormente, a avaliação da CL₅₀ e avaliações das lesões
223 teciduais realizadas através da histologia são duas metodologias amplamente
224 utilizadas em estudos de toxicidade. A CL₅₀ é o método mais utilizado para avaliação
225 de toxicidade aguda e sua padronização torna possível realizar comparações, com
226 ressalvas, entre diferentes tempos, compostos e espécies. Por outro lado, a histologia
227 é uma ferramenta eficaz para avaliar efeitos de concentrações subletais dos
228 contaminantes na água. Através da histologia é possível avaliar a ocorrência de lesões
229 nos tecidos e órgãos, sendo a brânquia o primeiro órgão a sofrer alterações quando as
230 condições ambientais não são favoráveis devido a sua membrana permeável e em
231 constante contato com a água (Bernet *et al.* 1999; Benli *et al.* 2008).

232

233 Tabela 2. Concentração letal mediana do nitrito para diversas espécies de peixes.

Espécie	Peso (g)	Temperatura (°C)	pH	Salinidade	CL ₅₀ -96h mg/L NO ₂ ⁻ -N	Referência
<i>Mugil liza</i>	0,19	25	7,34	0	1,51	Sampaio <i>et al.</i> 2002
			7,76	30	35,89	
<i>Trachinotus carolinus</i>	8,1	28	8,35	6,7	16,7	Weirich & Riche 2006b
			8,33	13,3	26,0	
			8,23	26,4	34,2	
<i>Trachinotus marginatus</i>	0,86	23,6	7,4	5,1	39,94	Costa <i>et al.</i> 2008
			7,8	10	116,68	
			8,1	30,1	37,55	
<i>Centropristis striata</i>	9,9	22,2	8,33	10,1	190,0	Weirich & Riche 2006a
			8,27	20,1	241,9	
			8,30	30,3	216,4	

234

235 Enfim, existem diversos estudos sobre a toxicidade dos compostos
 236 nitrogenados em diversas espécies de peixes. Porém, em peixes ornamentais
 237 marinhos, ainda existe uma grande carência de informação nessa área. Entre os
 238 poucos estudos realizados foram relatados a redução do crescimento e perda de cor
 239 em *A. ocellaris* expostos a 100 mg/L NO₃⁻-N (Frakes & Hoff 1982), e alterações
 240 histopatológicas nas brânquias e outros órgãos do peixe-palhaço maroon *P.*
 241 *biaculeatus*, devido a exposição a amônia (Rodrigues *et al.* 2012). Buscando
 242 aumentar o conhecimento sobre os efeitos dos compostos nitrogenados nos peixes-

243 palhaços o presente estudo estimou as CL_{50} 96 h de amônia e nitrito e avaliou os
244 efeitos histopatológicos destes contaminantes nas brânquias de juvenis de *A.*
245 *ocellaris*.
246

247 **Referências**

- 248 Ajith Kumar T. T., Balasubramanian T. (2009) Broodstock development, spawning
249 and larval rearing of the false clown fish, *Amphiprion ocellaris* in captivity
250 using estuarine water. *Current Science* **97**, 1483-1486.
- 251 Baldisserotto B. (2013) Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. *Editores da*
252 *UFMS*. 3^o Ed. Brasil, Santa Maria, RS. 352p.
- 253 Benli A. Ç. K., Köksal G., Özkul A. (2008) Sublethal ammonia exposure of Nile
254 tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) Effects on gill, liver and kidney histology.
255 *Chemosphere* **72**, 1355-1358.
- 256 Bernet D., Schmidt H., Meier W., Burkhardt-Holm P., Wahli T. (1999)
257 Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution.
258 *Journal of Fish Diseases* **22**, 25-34.
- 259 Cameron J. N. (1978) Regulation of blood pH in teleost fish. *Respiration Physiology*
260 **33**, 129-144.
- 261 Chapman F. A., Fitz-Coy S. A., Thunberg E. M., Adams C. M. (1997) United States
262 of America Trade in Ornamental Fish. *Journal of the World Aquaculture*
263 *Society* **28**, 1.
- 264 Costa, L. D. F., Miranda-Filho, K. C., Marlon, P. S., Sampaio, L. A. (2008) Tolerance
265 of juvenile *Trachinotus marginatus* to acute ammonia and nitrite exposure at
266 different salinity levels. *Aquaculture* **285**, 270-272.
- 267 Delbeek J.C. (2001) Coral farming: past, present and future trends. *Aquarium*
268 *Sciences and Conservation* **3**, 171-181.

- 269 Emparanza E. J. M. (2009) Problems affecting nitrification in commercial RAS with
270 fixed-bed biofilters for salmonids in Chile. *Aquacultural Engineering* **41**, 91-
271 96.
- 272 Foss A., Siikavuopio S. I., Sæther B.-S., Evensen T. H. (2004) Effect of chronic
273 ammonia exposure on growth in juvenile Atlantic cod. *Aquaculture* **237**, 179-
274 189.
- 275 Frakes T., Hoff F. H. (1982) Effect of high nitrate-N on the growth and survival of
276 juvenile and larval anemonefish, *Amphiprion ocellaris*. *Aquaculture* **29**, 155-
277 158.
- 278 Gutierrez-Wing M. T., Malone R. F. (2006) Biological filters in aquaculture: Trends
279 and research directions for freshwater and marine applications. *Aquacultural*
280 *Engineering* **34**, 163-171.
- 281 Ho A. L. F. C., O'Shea S. K., Pomeroy H. F. (2013) Dietary esterified astaxanthin
282 effects on color, carotenoid concentrations, and compositions of clown
283 anemonefish, *Amphiprion ocellaris*, skin. *Aquaculture International* **21**, 361-
284 374.
- 285 Hoff F. H. (1996) Conditioning, Spawning and Rearing of Fish. *Florida Aqua Farms*
286 *Inc.* USA, Dade City, FL. 213p.
- 287 Ip Y. K., Chew S. F. (2010) Ammonia production, excretion, toxicity, and defense in
288 fish: a review. *Frontiers in Physiology* **1**, 134.
- 289 Kroupova H., Machova J., Svobodova Z. (2005) Nitrite influence on fish: a review.
290 *Veterinární Medicína* **50**, 461-471.

- 291 Lim L. C., Dhert P., Sorgeloos P. (2003) Recent developments and improvements in
292 ornamental fish packaging systems for air transport. *Aquaculture Research* **32**,
293 923-935.
- 294 Madhu K., Madhu R., Krishnan L., Sasidharan C. S., Venugopalan K. M. (2006)
295 Spawning and larval rearing of *Amphiprion ocellaris* under captive conditions.
296 *Marine Fisheries Information Service, Technical and Extension Series* **188**, 1-5.
- 297 Parmentier, E., Colleye, O., Mann, D. (2009) Hearing ability in three clownfish
298 species. *The Journal of Experimental Biology* **212**, 2023-2026.
- 299 Person-Le Ruyet, J., Chartois, H., Quemener, L. (1995) Comparative ammonia acute
300 toxicity in marine fish and plasma ammonia response. *Aquaculture* **136**, 181–
301 194.
- 302 Randall, D. J., Tsui, T. K. N. (2002) Ammonia toxicity in fish. *Marine Pollution*
303 *Bulletin* **45**, 17-23.
- 304 Rhyne, A. L., Tlusty, M. F., Schofield, P. J., Kaufman, L, Morris, J. A. Jr., Bruckner,
305 A. W. (2012) Revealing the Appetite of the Marine Aquarium Fish Trade: The
306 Volume and Biodiversity of Fish Imported into the United States. *PLoS ONE* **7**,
307 e35808. doi:10.1371/journal.pone.0035808.
- 308 Rodrigues R. V., Schwarz M. H., Delbos B. C., Sampaio L. A. (2007) Acute toxicity
309 and sublethal effects of ammonia and nitrite for juvenile cobia *Rachycentron*
310 *canadum*. *Aquaculture* **271**, 553-557.
- 311 Rodrigues R. V., Romano L. A., Schwarz M. H., Delbos B., Sampaio L. A. (2012)
312 Acute tolerance and histopathological effects of ammonia on juvenile maroon

313 clownfish *Premnas biaculeatus*. *Aquaculture Research*, in press,
314 doi:10.1111/are.12054.

315 Russo R., Thurston R. (1977) The acute toxicity of nitrite to fishes. IN: R. Tubb
316 (Ed.). Recent advances in fish toxicology. *U.S. Environmental Protection*
317 *agency, EPA-600/3-77-085*. U.S. Government Printing office, Washington, D.
318 C., 1977. p.118-131.

319 Sampaio L. A., Wasielesky W., Miranda-Filho K. C. (2002) Effect of salinity on
320 acute toxicity of ammonia and nitrite to juvenile *Mugil platanus*. *Bulletin of*
321 *Environmental Contamination and Toxicology* **68**, 668-674.

322 Svobodová Z., Máchová J., Poleszczuk G., Huda J., Hamáckova J., Kroupova H.
323 (2005) Nitrite Poisoning of Fish in Aquaculture Facilities with Water-
324 recirculating systems. *Acta Veterinaria. BRNO* **74**, 129-137.

325 Thurston R. V., Russo R. C., Vinogradov G. A. (1981) Ammonia toxicity to fishes.
326 Effect of pH on the Toxicity of the Un-ionized ammonia. *American Chemical*
327 *Society* **15**, 837-840.

328 Tomasso J. R. (1994) Toxicity of nitrogenous wastes to aquaculture animals. *Reviews*
329 *in Fisheries Science* **2**, 291-314.

330 Vinatea Arana, L. Principios químicos de qualidade da água em aquicultura: uma
331 revisão para peixes e camarões. *Editora da UFSC*, 2ª Ed. Brasil, Florianópolis,
332 SC. 231p.

333 Wabnitz C., Taylor M., Green E., Razak T. (2003) From Ocean to Aquarium. UNEP-
334 WCMC, Cambridge, UK. 64p.

- 335 Watson C. A., Hill J. E. (2006) Design criteria for recirculating, marine ornamental
336 production systems. *Aquacultural Engineering* **34**, 157-162.
- 337 Weirich C. R., Riche M. (2006a) Tolerance of juvenile black sea bass *Centropristis*
338 *striata* to acute ammonia and nitrite exposure at various salinities. *Fisheries*
339 *Science* **72**, 915–921.
- 340 Weirich C. R., Riche M. (2006b) Acute tolerance of juvenile Florida pompano,
341 *Trachinotus carolinus* L., to ammonia and nitrite at various salinities.
342 *Aquaculture Research* **37**, 855-861.
- 343 Wittenrich M. L. (2007) The Complete Illustrated Breeder's Guide to Marine
344 Aquarium Fishes. *Microcosm Ltd. and T.F.H. Publications Inc.*, USA, Neptune
345 city, NJ. 303p.
- 346 Wuertz S., Schulze S. G. E., Eberhardt U., Schulz C., Schroeder J. P. (2013) Acute
347 and chronic nitrite toxicity in juvenile pike-perch (*Sander lucioperca*) and its
348 compensation by chloride. *Comparative Biochemistry and Physiology* **157**,
349 352-360.
- 350 Yasir I., Qin J. G. (2009) Impact of Background on Color Performance of False
351 Clownfish, *Amphiprion ocellaris*, Cuvier. *Journal of the World Aquaculture*
352 *Society* **40**, 724-734.
- 353

1

Artigo em Anexo.

2

3

4

5

6

7 **Ammonia and nitrite toxicity to false clownfish *Amphiprion ocellaris* (Cuvier 1830)**

8

1 **Ammonia and nitrite toxicity to false clownfish *Amphiprion ocellaris* (Cuvier 1830)**

2 Rafael Soriani Medeiros^{1*}; Bianca Lopez²; Luis André Sampaio¹; Luis Alberto Romano²;

3 Ricardo Vieira Rodrigues¹

4 ¹Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha, Universidade Federal do Rio Grande –

5 FURG, CP 474, Rio Grande, RS, 96201-900, Brazil

6 ²Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos, Universidade Federal do Rio Grande –

7 FURG, CP 474, Rio Grande, RS, 96201-900, Brazil

8

9 *Correspondence: Rafael Soriani Medeiros

10 e-mail: r.sorianimedeiros@gmail.com

11 Tel: + 55 53 32361685, Fax: +55 53 32368042

12 Running title: Ammonia and nitrite toxicity to false clownfish.

13 Keywords: gill, histology, median lethal concentration, nitrogenous compounds.

14

15 **Abstract**

16 False clownfish is one of the most commercialized fish in the world and several
17 companies are producing this specie to supply the aquarium market. The high stocking
18 densities used to maximize fish production can increase ammonia and nitrite to toxic levels.
19 In this work, *A. ocellaris* juveniles (1.20 ± 0.34 g) were exposed to six concentrations of
20 ammonia (0.23, 0.57, 0.97, 1.05, 1.22 and 1.63 mg.L⁻¹ NH₃-N) and eight concentrations of
21 nitrite (26.28, 53.26, 72.48, 111.27, 132.38, 157.42, 178.37 and 202.18 mg.L⁻¹ NO₂⁻-N). So
22 the LC₅₀ 24, 48, 72 and 96 hours of NH₃ and of NO₂⁻ we calculated being 1.06, 0.83, 0.75
23 and 0.75 mg.L⁻¹ NH₃-N and 188.29, 151.01, 124.06 and 108.79 mg.L⁻¹ NO₂⁻-N. Analysis of
24 the gill lesions caused by sub-lethal concentrations of these nitrogenous compounds
25 showed that both nitrogenous compounds induced tissue lesions such as hyperplasia of
26 epithelium cells, hypertrophy of chloride cells and lamellar lifting to all concentrations
27 tested. However histopathological alterations were more compiscuos accordingly the
28 increase of ammonia or nitrite with fish exposed to 0.57 mg.L⁻¹ NH₃-N or 100 mg.L⁻¹ NO₂⁻-
29 N presenting lamellar fusion of secondary lamella.

30

31 **Introduction**

32 The false clownfish, *Amphiprion ocellaris*, is one of the most commercialized
33 marine ornamental fish in the world being the most exported fish between 1997 and 2002
34 (Walbnitz, Taylor, Green & Razak 2003). The genus *Amphiprion* was one of the first
35 marine ornamental species successfully cultured (Hoff 1996). These fish have been raised
36 commercially since early 50's and currently the reproduction and juvenile production has

37 well established protocols with high larval survival (Hoff 1996; Wittenrich 2007).
38 Nowadays, with the popularity of marine aquariums, strongest restrictions to wild fish
39 capture, and the preference of some aquarists for captive bred fish, the demand for these
40 fish has enhanced. Between May 2004 and May 2005, the *A. ocellaris* and the very similar
41 clownfish *Amphiprion percula*, ranked fifth among imported ornamental marine fish to the
42 USA (Rhyne, Tlusty, Schofield, Kaufman, Morris & Bruckner 2012) and probably it is not
43 the first due to the many fish farms producing clownfish in the USA. In order to supply the
44 demand, clownfish are often raised in recirculating aquaculture systems (RAS), which
45 allow high stocking densities and production maximization (Watson & Hill 2006).

46 The high fish densities, added to the high protein levels of fish diets, increase the
47 content of nitrogenous compounds dissolved in the water (Ellis, North, Scott, Bromage,
48 Porter & Gadd 2002). Ammonia is the main nitrogenous compound excreted by fish and it
49 occurs in two forms: un-ionized (NH_3) or ionized (NH_4^+). The $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ ratio depends on
50 the water pH, temperature, and salinity (Thurston, Russo & Vinogradov 1981). Nitrite
51 (NO_2^-) is the intermediate product of nitrification, which ends with the formation of nitrate
52 (Rijn 1996). Ammonia and nitrite can reach toxic levels to fish within a few days, leading
53 to physiological impairment and eventually death of the exposed animals (Randall & Tsui,
54 2002; Kroupova, Machova & Svobodova, 2005).

55 The acute toxicity of ammonia and nitrite has been studied in several fish species
56 (Sampaio, Wasielesky & Miranda-Filho 2002; Weirich & Riche 2006; Rodrigues, Schwarz,
57 Delbos & Sampaio 2007) using the traditional median lethal concentration test (LC_{50}). The
58 nitrogenous compounds, although not always reach lethal concentrations, however may
59 cause tissue damage, which does not appear visible (Lease, Hansen, Bergman & Meyer,

60 2003). In this sense, histological techniques are a good and usual procedure to evaluate and
61 demonstrate tissue lesions caused by sublethal concentrations of aquatic pollution in fish
62 (Bernet, Schmidt, Meier, Burkhardt-Holm & Wahli 1999; Benli, Köksal & Özkul 2008).
63 Even though several studies have been done combining both techniques (LC₅₀ and
64 histology) to determine safe levels of nitrogenous compounds to fish culture (Rodrigues,
65 Schwarz, Delbos, Carvalho, Romano & Sampaio 2011; Rodrigues, Romano, Schwarz,
66 Delbos & Sampaio 2012), there is little information about the toxicity of nitrogenous
67 compounds on clownfish.

68 Therefore, the present study aims to expand the knowledge on culture of *A.*
69 *ocellaris*, determining the LC₅₀ of ammonia and nitrite, and evaluating gill lesions caused
70 by sub-lethal concentrations of both toxics.

71

72 **Materials and Methods**

73 *Experimental fish*

74 Fish were produced from natural spawning of clownfish broodstock maintained in
75 recirculating aquaculture systems at the experimental hatchery of the Universidade Federal
76 do Rio Grande - FURG (Brazil). Juveniles were fed a commercial diet (55% protein, 9%
77 lipids - Inve aquaculture, NRD, Belgium) *ad libitum* three times a day. At the time of the
78 experiments, the mean body mass was 1.20 ± 0.34 g.

79

80 *Acute toxicity assays*

81 Juvenile clownfish were exposed to six concentrations of ammonia (0.23, 0.57,
82 0.97, 1.05, 1.22 and 1.63 mg.L⁻¹ NH₃-N) obtained adding ammonium chloride to the water

83 and eight concentrations of nitrite (26.28, 53.26, 72.48, 111.27, 132.38, 157.42, 178.37 and
84 202.18 mg.L⁻¹ NO₂⁻-N) with addition of sodium nitrite to the water, plus a control, all in
85 triplicates. Mean concentration achieved in each treatment is presented Table 1.

86 Tests were carried out into 15 L cylindrical tanks in static system. All tanks were
87 held in a water bath for temperature control, and were aerated by blower connected by air
88 stones during all tests. Photoperiod was maintained at 12/12 light/dark. Ions chloride,
89 calcium and magnesium were measured before the start of the trials and were, 15.41 ± 0.32,
90 0.320 ± 0.011 and 1.004 ± 0.011 g.L⁻¹ respectively. Chloride were determined accordingly
91 methodology proposed by Clesceri, Greenbergh & Trussell (1989) and Calcium and
92 magnesium according to Basset, Denney, Jeffery & Mendham (1981) respectively. During
93 the trial, water quality parameters were measured once a day. Salinity was measured with
94 refractometer (Atago, S/Mill-E, Japan) and was maintained at 27 g.L⁻¹. Dissolved oxygen
95 concentration and temperature were measured with an oximeter (YSI, 550A, United States)
96 and were always above 6 mg.L⁻¹ O₂ and 27 °C respectively. The pH was measured with a
97 digital pHmeter (Mettler Toledo, FiveEasy FE20, Switzerland) and was 8.15 ± 0.02
98 respectively. The alkalinity was measured by titrimetry (Rocha, Kersanach & Baumgarten
99 2010) and was 180.00 ± 5 mg.L⁻¹ CaCO₃. Total ammonia nitrogen (TA-N) and nitrite were
100 measured according to Grasshoff, Ehrhardt & Kremling (1999) and Aminot & Chaussepied
101 (1983). Un-ionized ammonia (NH₃) concentrations were calculated following TA-N,
102 temperature, salinity and pH values accordingly the equations of Ostrensky *et al.* (1992)
103 adapted from Whitfield (1974) and Bower & Bidwell (1978).

104 Fish were starved 24 h before and throughout the trials to minimize the nitrogenous
105 compounds excretion during the test. At the start of the experiment, five fish were

106 distributed in each tank. Mortality and swimming behavior, like erratic swimming, letargic
107 behavior and loss of equilibrium, were checked every 12 hours. Immobile individuals, with
108 no opercular movement, and not responding to mechanical stimuli were considered dead
109 and removed from the tanks. This work was approved by the ethic committee of
110 Universidade Federal do Rio Grande - FURG (process number 23116.006275/2013-88).

111

112 *Histopathological analyses*

113 At the end of the trials, three fish per tank were randomly sampled and euthanized
114 in a benzocaine solution (300 ppm) for histopathology analyses. The samples were fixed in
115 Bouin liquid and dehydrated for Paraplast inclusion with an automatically processor
116 (LUPETEC, PT 05, Brazil). Sections (width 3 μ m) were prepared with a microtome
117 (LUPETEC, MRP03, Brazil), stained with haematoxylin and eosin, and slides were
118 analyzed using optical microscope (NIKON, Eclipse E200, Japan). Quantitative analyses of
119 tissue lesions were based on at least 200 gill secondary lamellae of each fish. The organ
120 lesion index were carried out according to methodology proposed by Bernet *et al.* (1999),
121 where the organ index (I_{org}) is calculated as: $I_{org} = \sum_{rp} \sum_{alt}(a.w)$, where "rp" is the reaction
122 pattern, "alt" is the alteration, "a" is a score value related to the alteration frequency, and
123 (w) is the importance factor related to the relevance of the alteration (Tab. 2).

124

125 *Statistical analyses*

126 Median lethal concentrations (LC_{50}) were calculated for 24, 48, 72 and 96 h using
127 the Trimmed Spearman Karber Method (Hamilton, Russo & Thurston 1977). Comparisons
128 among LC_{50} , and histopathological index were done using ANOVA one-way followed by

129 Newman-Keuls post-hoc test on software STATISTICA 7.0. Data of LC₅₀ are presented as
130 mean ± 95% confidence interval and the others data are mean ± standard error.

131

132 **Results**

133 Median lethal concentrations to 24, 48, 72, and 96 hours and their confidence
134 intervals are shown in Table 3. The LC₅₀ 96h for un-ionized ammonia and nitrite were 0.75
135 mg.L⁻¹ NH₃-N and 108.79 mg.L⁻¹ NO₂⁻-N, respectively. No mortality was observed at
136 concentrations equal to or lower than 0.57 mg.L⁻¹ NH₃-N or 50 mg.L⁻¹ NO₂⁻-N.

137 Fish exposed to 0.23 or 0.57 mg.L⁻¹ NH₃-N did not show any behavioral changes.
138 All fish died at concentrations equal or higher than 1.22 mg.L⁻¹ NH₃-N, and just one fish
139 survived at 0.97 and 1.05 mg.L⁻¹ NH₃-N, with no behavior impairment. Throughout the
140 nitrite exposure trial, the swimming performance of fish exposed to 25 mg.L⁻¹ NO₂⁻-N was
141 not affected. Nevertheless, fish exposed to concentrations equal to or higher than 50 mg.L⁻¹
142 NO₂⁻-N presented lethargic behavior, erratic swimming and hyperventilation. At the end of
143 96 h, all fish exposed to concentrations equal to or higher than 125 mg.L⁻¹ NO₂⁻-N were
144 dead.

145 Histopathological analyses of the gills of fish exposed to different ammonia and
146 nitrite concentrations revealed alterations, and the frequency of abnormalities were more
147 severe accordingly increased the ammonia or nitrite concentrations (Fig. 1; Fig. 2). Fish
148 exposed to ammonia and nitrite presented lamellar lifting (Fig. 2B), hyperplasia and
149 hypertrophy of chloride cells and hyperplasia of the epithelial cells (Fig. 2C), but the
150 frequency of alterations rose according to the increase in the ammonia and nitrite levels.
151 Fish exposed to 0.57 mg.L⁻¹ NH₃-N or 100 mg.L⁻¹ NO₂⁻-N also presented lamellar fusion of

152 the secondary lamella (Fig, 2D). Significant differences ($P < 0.05$) in the Bernet's lesion
153 index were found between the control and $0.57 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NH}_3\text{-N}$ or the control and 25 or more
154 $\text{mg.L}^{-1} \text{ NO}_2^- \text{-N}$ (Fig. 1A and B).

155

156 **Discussion**

157 The results of the present study show that juvenile *A. ocellaris* is sensitive to
158 ammonia (LC_{50} 96 h $0.75 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NH}_3\text{-N}$). It is more sensitive than maroon clownfish,
159 *Premnas biaculeatus* (LC_{50} 96 h $0.89 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NH}_3\text{-N}$) (Rodrigues *et al.* 2012), and some
160 table fish such as the Florida pompano, *Trachinotus carolinus* (LC_{50} 96 h $1.01 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NH}_3\text{-}$
161 N) and the cobia, *Rachycentron canadum* (LC_{50} 96 h $1.13 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NH}_3\text{-N}$) (Weirich &
162 Riche 2006; Rodrigues *et al.* 2007). Special attention should be given to this compound,
163 since the concentration of ammonia is the first, among nitrogenous compounds, to rise in
164 aquariums or production systems, and even at low concentrations it may cause gill lesions.
165 Daily basis measure of ammonia in the first month after fish stocking and until the
166 complete biofilter maturation and water renovation when the ammonia increases may avoid
167 mortalities.

168 Despite the sensitivity to ammonia, juvenile false clownfish is relatively resistant to
169 nitrite (LC_{50} 96 h $108.79 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NO}_2^- \text{-N}$) comparing with other species. It is more resistant
170 than *Paralichthys orbignyanus* (LC_{50} 96 h $30.57 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NO}_2^- \text{-N}$) and *Trachinotus carolinus*
171 (LC_{50} 96 h $34.2 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NO}_2^- \text{-N}$) (Bianchini, Wasielesky & Miranda-Filho 1996; Weirich &
172 Riche 2006). The main nitrite toxicity occurs when nitrite oxidizes hemoglobin to
173 metahemoglobin, causing hypoxia (Kroupova *et al.* 2005). By contrast, in this reaction to
174 form metahemoglobin the nitrite is transformed to nitrate, in a way that the same reaction

175 that reduces oxygen carrying capacity also reduce the toxic agent concentration in the blood
176 (Kosaka & Tyuma 1987). Also, the metahemoglobin reductase present in fish can turn
177 metahemoglobin to hemoglobin, restoring the oxygen carrying capacity (Scott &
178 Harrington 1985). This mechanism could contribute to the survival of the fish exposed to
179 $75 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NO}_2^- \text{-N}$ or less, after the end of nitrite the trial.

180 Gill alterations due to ammonia or nitrite toxicity observed in the present study were
181 also reported in maroon clownfish exposed to $0.75 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NH}_3\text{-N}$ (Rodrigues *et al.* 2012),
182 in rainbow trout exposed to $0.25 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NH}_3\text{-N}$ (Smart 1976) and in various other fish
183 species exposed to ammonia such as Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Benli *et al.* 2008),
184 and silver catfish *Rhamdia quelen* (Miron, Moraes, Becker, Crestani, Spanevello, Loro &
185 Baldisserotto 2008). The frequency of the lesions rose accordingly with the increasing
186 levels of ammonia or nitrite, similar to the results presented by Lease, Hansen, Bergman &
187 Meyer (2003); Rodrigues *et al.* (2012) and Wuertz, Schulze, Eberhardt, Schulz &
188 Schroeder (2013). The gill is very susceptible to toxics due to its direct and constant contact
189 with the water (Bernet *et al.* 1999).

190 Hyperplasia and hypertrophy of chloride cells, hyperplasia of the epithelial cells and
191 lamellar fusion are probably adaptive histopathologies of the epithelium to toxicant
192 exposure. The hyperplasia and hypertrophy of chloride cells may occur to increase active
193 excretion of these toxicants, and the others lesions may occurs to reduces the surface area
194 of gill in direct contact with the toxicant (Mallat 1985). Nevertheless, these
195 histopathologies can compromise fish respiration and ionoregulation, and impair excretion
196 of nitrogenous compounds (Kroupova *et al.* 2005), increasing the toxicity of ammonia and
197 nitrite.

198

199 A possible way to help protect juvenile clownfish *A. ocellaris* from the toxic effect
200 of ammonia is maintaining a slight low pH to reduce the $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ ratio as NH_3 is more
201 toxic due its capacity to diffuse through gill membrane while NH_4^+ needs an active
202 transporter (Ip & Chew 2010). And in higher salinities, that reduce the toxicity of nitrite
203 once this nitrogen compound pass through gill membrane, mainly by band 3 transporter
204 competing with chloride. Thus, with higher chloride concentration in ambient water more
205 difficult is to ambient nitrite reach the fish blood (Kroupova *et al.* 2005).

206 Further, one reaction to stress is the loss of color intensity (Mazeaud, Mazeaud &
207 Donaldson 1977), which is an important characteristic to ornamental fish, since it reduces
208 its attractiveness, and consequently market value. Therefore, in the ornamental fish trade, it
209 is important to assure animal's health and avoid fish stress providing a good water quality
210 with special attention to these nitrogen compounds.

211 In conclusion, *A. ocellaris* is more sensitive to ammonia than to nitrite but both
212 toxics can cause mortalities ($\text{LC}_{50} 96 \text{ h} = 0.75 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NH}_3\text{-N}$ and $108.79 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NO}_2^-\text{-N}$).
213 And gill histology proved to be efficient to evaluate the effects of sublethal concentrations
214 of ammonia and nitrite showing significant increase of lesions at $0.57 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NH}_3\text{-N}$ and
215 $25 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NO}_2^-\text{-N}$.

216

217 **Acknowledgments:**

218 The authors appreciate the support of CAPES, MCTI/CNPq, MPA, FAPERGS and
219 FURG.

220

221 **References**

- 222 Aminot A., Chaussepied M. (1983) Manuel des analyses chimiques en milieu marin. 395p.
223 Brest: CNEXO, France.
- 224 Basset J., Denney R. C., Jeffrey G. H., Mendham J. (1981) Análise inorgânica quantitativa.
225 690p. *Vogel*, Brazil, Rio de Janeiro, RJ.
- 226 Benli A. Ç. K., Köksal G., Özkul A. (2008) Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia
227 (*Oreochromis niloticus* L.) Effects on gill, liver and kidney histology. *Chemosphere*
228 **72**, 1355-1358.
- 229 Bernet D., Schmidt H., Meier W., Burkhardt-Holm P., Wahli T. (1999) Histopathology in
230 fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases* **22**,
231 25-34.
- 232 Bianchini A., Wasielesky W., Miranda Filho K. C. (1996) Toxicity of Nitrogenous
233 Compounds to Juveniles of Flatfish *Paralichthys orbignyanus*. *Bulletin of*
234 *Environmental Contamination and Toxicology* **56**, 453-459.
- 235 Bower C. E., Bidwell J. (1978) Ionization of ammonia in seawater: effects of temperature,
236 pH, and salinity. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **35**, 1012-1016.
- 237 Clesceri L. S., Greenbergh A. E., Trussel R. R. (1989) Standard Methods: For Examination
238 of Water and Wastewater. *17th edition*, USA, Washington.
- 239 Ellis T., North B., Scott A. P., Bromage N. R., Porter M., Gadd D. (2002) The relationships
240 between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *Journal of fish biology*
241 **61**, 493-531.
- 242 Grasshoff K. M., Ehrhardt K., Kremling K. (1999) Methods of seawater analysis. 600p.
243 *Wiley-VCH*, Germany, Weinheim.

244 Hamilton M. A., Russo R. C., Thurston R. V. (1977) Trimmed Spearman-Kärber method
245 for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental*
246 *Science & Technology* **11**, 714-719.

247 Hoff F. H. (1996) Conditioning, Spawning and Rearing of Fish. 213p. *Florida Aqua Farms*
248 *Inc.* USA, Dade City, FL.

249 Ip Y. K., Chew S. F. (2010) Ammonia production, excretion, toxicity, and defense in fish: a
250 review. *Frontiers in Physiology* **1**, 1-20.

251 Kosaka H., Tyuma I. (1987) Mechanism of autocatalytic oxidation of oxyhaemoglobin by
252 nitrite. *Environmental Health Perspectives* **73**, 147-151.

253 Kroupova H., Machova J., Svobodova Z., (2005) Nitrite influence on fish: a review.
254 *Veterinárni Medicína* **50**, 461-471.

255 Lease H. M., Hansen J. A., Bergman H. L., Meyer J. S. (2003) Structural changes in gills of
256 Lost River suckers exposed to elevated pH and ammonia concentrations.
257 *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **134**, 491-500.

258 Mallat J. (1985) Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a
259 statistical review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **42**, 630-648.

260 Mazeaud M. M., Mazeaud F., Donaldson E. M. (1977) Primary and Secondary Effects of
261 Stress in Fish: Some New Data with a General Review. *Transactions of the American*
262 *Fisheries Society* **106**, 201-212.

263 Miron D. dos S., Moraes B., Becker A. G., Crestani M., Spanevello R., Loro V. L.,
264 Baldisserotto B. (2008) Ammonia and pH effects on some metabolic parameters and
265 gill histology of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae). *Aquaculture* **277**,
266 192-196.

267 Ostrensky A., Marchiori M. A., Poersch L. H. (1992) Toxicidade aguda da amônia no
268 processo produtivo de pós-larvas de *Penaeus paulensis*, Pérez-Farfante, 1967. *Anais*
269 *da Academia Brasileira de Ciências* **64**, 383-389.

270 Randall, D. J., Tsui, T. K. N. (2002) Ammonia toxicity in fish. *Marine Pollution Bulletin*
271 **45**, 17-23.

272 Rhyne, A. L., Tlusty, M. F., Schofield, P. J., Kaufman, L., Morris, J. A. Jr., Bruckner, A. W.
273 (2012) Revealing the Appetite of the Marine Aquarium Fish Trade: The Volume and
274 Biodiversity of Fish Imported into the United States. *PLoS ONE* **7**, 5, e35808.
275 doi:10.1371/journal.pone.0035808.

276 Rijn J. V. (1996) The potential for integrated biological treatment systems in recirculating
277 fish culture - A review. *Aquaculture* **139**, 181-201.

278 Rocha J. M. B., Kersanach M. W., Baumgarten M. G. Z. (2010) TITRIMETRIA
279 (VOLUMETRIA). IN: Manual de Análises em Oceanografia Química. (ed. by
280 Baumgarten M. G. Z., Kersanach M. W., Niencheski L. F. H.) pp. 31-61. Editora da
281 FURG, Brasil.

282 Rodrigues R. V., Schwarz M. H., Delbos B. C., Sampaio L. A. (2007) Acute toxicity and
283 sublethal effects of ammonia and nitrite for juvenile cobia *Rachycentron canadum*.
284 *Aquaculture* **271**, 553-557.

285 Rodrigues R. V., Schwarz M. H., Delbos B. C., Carvalho E. L., Romano L. A., Sampaio L.
286 A. (2011) Acute exposure of juvenile cobia *Rachyventron canadum* to nitrate induces
287 gill esophageal and brain damage. *Aquaculture* **322-323**, 223-226.

288 Rodrigues R. V., Romano L. A., Schwarz M. H., Delbos B., Sampaio L. A. (2012) Acute
289 tolerance and histopathological effects of ammonia on juvenile maroon clownfish
290 *Premnas biaculeatus*. *Aquaculture Research*, in press, doi:10.1111/are.12054

291 Sampaio L. A., Wasielesky W., Miranda-Filho K. C. (2002) Effect of salinity on acute
292 toxicity of ammonia and nitrite to juvenile *Mugil platanus*. *Bulletin of Environmental*
293 *Contamination and Toxicology* **68**, 668-674.

294 Scott E. M., Harrington J. P. (1985) Methemoglobin reductase activity in fish erythrocytes.
295 *Comparative Biochemistry and Physiology* **82**, 511-513.

296 Smart G. (1976) The effect of ammonia exposure on gill structure of rainbow trout (*Salmo*
297 *gairdneri*). *Journal of Fish Biology* **8**, 471-475.

298 Thurston R. V., Russo R. C., Vinogradov G. A. (1981) Ammonia toxicity to fishes. Effect
299 of pH on the Toxicity of the Un-ionized ammonia. *American Chemical Society* **15**,
300 837-840.

301 Wabnitz C., Taylor M., Green E., Razak T. (2003) From Ocean to Aquarium. 64p. UNEP-
302 WCMC, Cambridge, UK.

303 Watson C. A., Hill J. E. (2006) Design criteria for recirculating, marine ornamental
304 production systems. *Aquacultural Engineering* **34**, 157-162.

305 Weirich C. R., Riche M. (2006) Acute tolerance of juvenile Florida pompano, *Trachinotus*
306 *carolinus* L., to ammonia and nitrite at various salinities. *Aquaculture Research* **37**,
307 855-861.

308 Whitfield M. (1974) The hydrolysis of ammonium ions in sea water - a theoretical study.
309 *Journal of Marine Biology U. K.* **54**, 565 - 580.

- 310 Wittenrich M. L. (2007) The Complete Illustrated Breeder's Guide to Marine Aquarium
311 Fishes. 303p. *Microcosm Ltd. and T.F.H. Publications Inc., USA*, Neptune city, NJ.
- 312 Wuertz S., Schulze S. G. E., Eberhardt U., Schulz C., Schroeder J. P. (2013) Acute and
313 chronic nitrite toxicity in juvenile pike-perch (*Sander lucioperca*) and its
314 compensation by chloride. *Comparative Biochemistry and Physiology* **157**, 352-360.

315 **Tables**

316 Table 1. Mean concentration \pm standard error for total ammonia nitrogen (TA-N),
 317 unionized ammonia (NH₃-N) and nitrite (NO₂⁻-N) in each treatment.

Test	Treatments									
Ammonia	Control	4	8	12	16	20	24	-	-	-
TA-N	0.12	3.93	8.13	13.33	17.50	22.42	26.05			
	± 0.37	± 0.15	± 0.25	± 0.73	± 0.82	± 0.25	± 0.54			
NH ₃ -N	0.01	0.23	0.57	0.97	1.05	1.22	1.63			
	± 0.00	± 0.06	± 0.03	± 0.05	± 0.06	± 0.05	± 0.14			
Nitrite	Control	25	50	75	100	125	150	175	200	
NO ₂ ⁻ -N	0.02	26.28	53.26	72.48	111.27	132.38	157.42	178.37	202.18	
	± 0.01	± 0.69	± 1.01	± 4.88	± 1.19	± 1.46	± 0.94	± 1.22	± 3.50	

318

- 1 Table 2. Importance factor and score value used to quantify histological lesions adapted of
- 2 Bernet *et al.* 1999.

Importance factor (w)	Score value (a): % of lamellae presenting alterations
1 - minimal pathological importance, the damage is reversible	0 – unchanged 1 - 0.1 to 16.6
2 - moderate pathological importance, the lesions is reversible in some cases	2 - 16.7 to 33.3 3 - 33.4 to 49.9
3- marked pathological importance, usually irreversible and leads to loss of organ function	4 - 50.0 to 66.6 5 - 66.7 to 83.3 6 - 83.4 to 100

- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11

12 Table 3. Median lethal concentrations (95% confidence intervals) of NH₃ and NO₂⁻ to
 13 different exposure times. Different letters indicate significant differences (P<0.05) among
 14 treatments.

LC ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Time (h)			
	24	48	72	96
NH ₃ -N	1.06 ^a (0.96 - 1.16)	0.83 ^b (0.77 - 0.88)	0.75 ^b (0.72 - 0.78)	0.75 ^b (0.72 - 0.78)
NO ₂ ⁻ -N	188.29 ^a (185.28 - 191.34)	151.01 ^b (141.74 - 160.89)	124.06 ^c (116.45 - 132.18)	108.79 ^c (100.15 - 118.18)

15

16 **Figures Legends**

17 Fig 1: Gill Lesion Index: Lesion Index (mean \pm standard error) after 96 hours exposure to
18 different NH_3 (A) or NO_2^- (B) concentrations. Different letters represent significant
19 differences in statistical test $P < 0.05$.

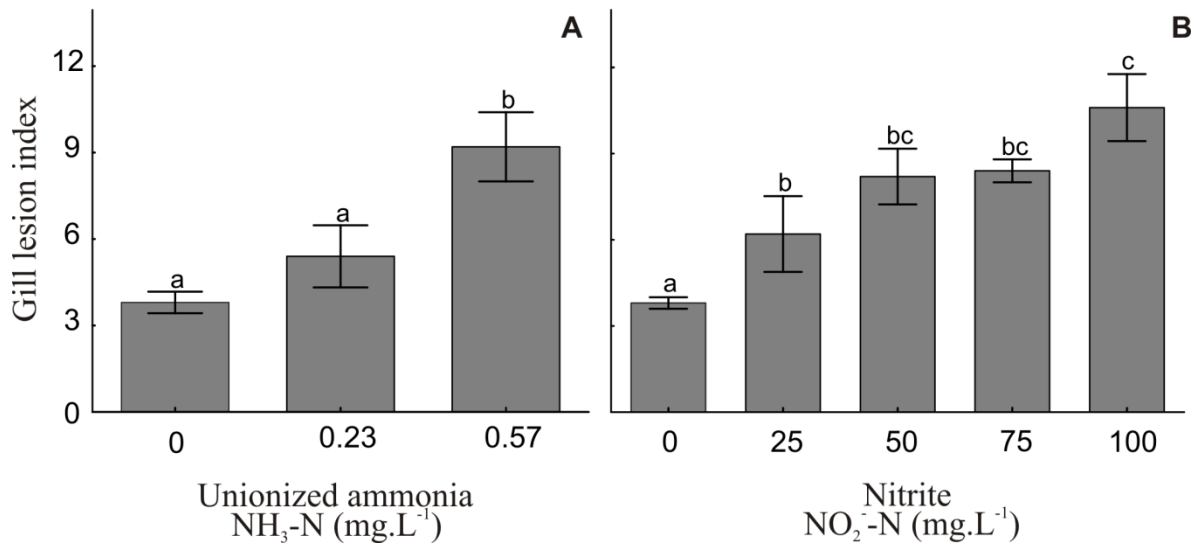
20 Fig 2: Gill of juvenile clownfish: (A) Control group; (B) and (C) Fish exposed to 0.24
21 mg.L^{-1} $\text{NH}_3\text{-N}$ showing lamellar lifting (yellow arrow) hyperplasia of first lamellae (white
22 arrow) and hypertrophy of chloride cells (black arrow). (D) Fish exposed to 0.57 mg.L^{-1}
23 $\text{NH}_3\text{-N}$ showing lamellar fusion (red arrow), hyperplasia of first lamellae (white arrow). H-
24 E (400x)

25

26 **Figures**

27 Fig 1:

28



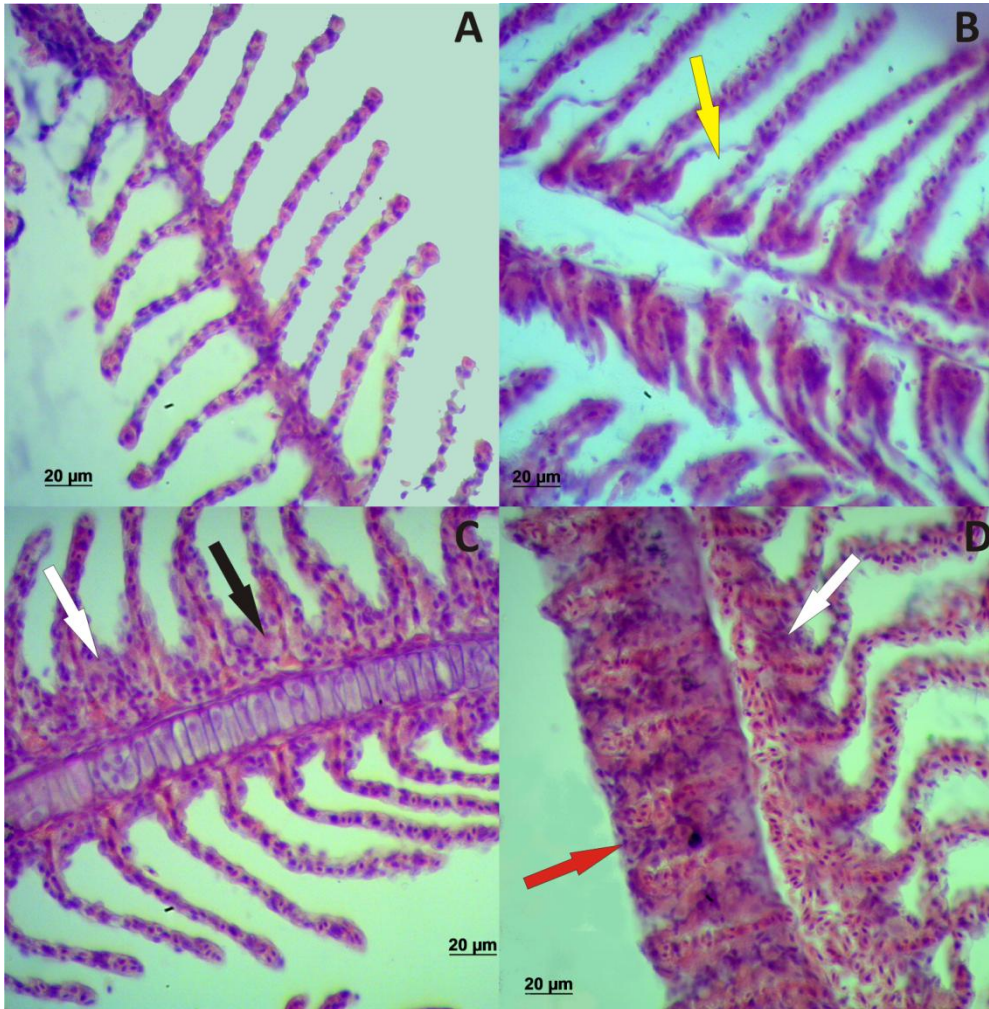
29

30

31

32 Fig 2:

33



34

1 **Conclusões**

2 O peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris* é sensível a amônia e ao nitrito sendo que a
3 concentração letal mediana de 96 horas para amônia não ionizada e nitrito são 0,75 mg/L
4 $\text{NH}_3\text{-N}$ e 108,79 mg/L $\text{NO}_2^-\text{-N}$ respectivamente. No entanto, concentrações de 0,57 mg/L
5 $\text{NH}_3\text{-N}$ e 25 mg/L $\text{NO}_2^-\text{-N}$ são suficientes para gerar aumento significativo de
6 histopatologias nas brânquias. Sendo importante a manutenção destes peixes em águas com
7 baixas concentrações desses compostos nitrogenados.

8